

## Capítulo I

# INTRODUÇÃO TEÓRICA

# 1. A Leishmaniose

## 1.1 Aspectos gerais e epidemiologia

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por um protozoário intra-macrofágico obrigatório, pertencente à ordem Kinetoplastida, família TRYPANOSOMATIDAE e do género *Leishmania* Ross, 1903. Estes parasitas infectam muitas espécies de mamíferos, incluindo os humanos, e são transmitidos através da picada de um insecto díptero hematófago com não mais de 2 a 3 mm de comprimento da Família *Psychodidae*, género *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo.

De acordo com estudos de Lainson & Shaw (1987) e Rioux *et al.* (1990), o género *Leishmania* engloba dois subgéneros: o subgénero *Leishmania* (L.) Safjanova, 1982 no Velho e no Novo Mundo, e o subgénero *Viannia* (V.) Lainson & Shaw, 1987, unicamente no Novo Mundo.

Das cerca de 30 espécies de *Leishmania* identificadas, 21 espécies infectam o Homem (Shaw, 1994). Estas infecções são maioritariamente zoonoses, tendo como hospedeiros principais mamíferos silváticos ou domésticos (Herwaldt, 1999).

De um modo geral, podem distinguir-se as espécies de *Leishmania* em viscerotrópicas e dermatotrópicas (Dedet, 2000), sendo estas últimas as espécies que nunca foram encontradas como causadoras de manifestações viscerais. Dentro das viscerotrópicas destacam-se: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* / *L. (L.) chagasi* que provocam leishmaniose visceral. Estudos enzimáticos (Lanotte, 1975) e, mais recentemente, estudos genéticos demonstraram que *Leishmania (L.) chagasi* é indistinguível de *Leishmania (L.) infantum* (Maurício *et al.*, 2000; Kuhls *et al.*, 2005, 2007). Crê-se na hipótese de o parasita ter sido introduzido na América do Sul, através dos reservatórios cão e

roedores, durante a colonização (Maurício *et al.*, 2000; Lukeš *et al.*, 2007). Por este facto, neste trabalho, *L. chagasi* será tratada como *L. infantum*.

As espécies dermatópicas são: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*; *L. (L.) tropica*; *L. (L.) major*; *L. (L.) aethiopica*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L. (V.) peruviana*, as quais provocam leishmaniose cutânea e/ou mucocutânea.

Clinicamente a infecção por *Leishmania* evolui de modo diferente, dependendo da espécie de *Leishmania* e do estado imunitário do hospedeiro, variando desde uma lesão cutânea de cura espontânea, até uma infecção sistémica fatal, constituindo assim, um complexo grupo de doenças (Campino, 1998). Apresenta-se basicamente sob três formas: a visceral ou Kala-azar (LV), a cutânea (LC), localizada (LCL) ou difusa (LCD) e a mucocutânea (LMC), que resultam da replicação do parasita dentro de macrófagos no sistema mononuclear fagocítico, na derme e na mucosa nasofaríngea, respectivamente (Herwaldt, 1999).

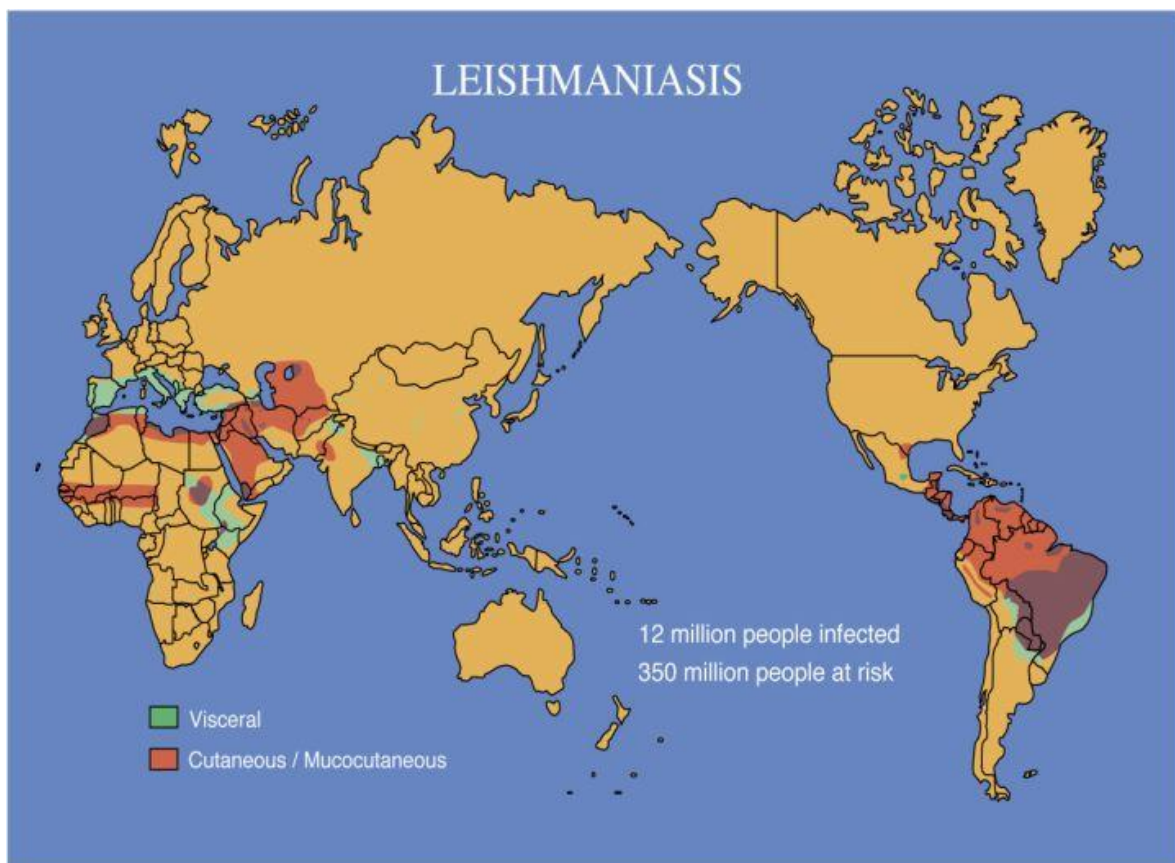
A Leishmaniose é endémica em 88 países (67 do Velho Mundo e 21 do Novo Mundo), sendo nas últimas décadas a única doença tropical, transmitida por um vector, endémica no Sul da Europa, morrendo anualmente mais de 60.000 doentes. A prevalência mundial é de 12 milhões de casos com milhão e meio a dois milhões de novos casos por ano: quinhentos mil casos de leishmaniose visceral e de um a um milhão e meio de novas leishmanioses cutâneas (Desjeux, 2004; WHO, 2010).

A leishmaniose é considerada pela DNIi (Drugs for Neglected diseases initiative) como uma doença "extremamente negligenciada", assim como a doença do sono e a doença de Chagas. Isto porque, devido à extrema pobreza dos pacientes, não há interesse por parte da indústria farmacêutica, em desenvolver novos medicamentos para essas doenças (WHO, 2010).

Tem-se assistido a um aumento da incidência da infecção e da sua distribuição geográfica. Este aumento está relacionado com diversos factores de risco, sendo o aquecimento global apenas

um deles. As migrações populacionais, quer por razões económicas, políticas ou lúdicas, levam a: alterações na amplitude e densidade das populações de vectores e/ou reservatórios; à implementação de populações humanas não imunes em zonas de endemia e ao transporte transcontinental de microrganismos. Outros factores de risco são as modificações no ambiente, a urbanização da leishmaniose e a ruralização da SIDA, estes dois últimos, em conjunto, são responsáveis pelo aumento da incidência de casos de co-infecção (Desjeux, 2001, 2004).

**Figura 1** Distribuição das Leishmanioses no Mundo



fonte: [www.wehi.edu.au](http://www.wehi.edu.au)

É apresentado no Quadro 1 um resumo das principais espécies do género *Leishmania* no Velho e no Novo Mundo, dos vectores, dos reservatórios e da distribuição geográfica associada.

**Quadro 1** Quadro resumo dos vectores, distribuição geográfica e principais reservatórios de *Leishmania* sp

Espécie	Vectores	Distribuição geográfica	Principais Reservatórios
---------	----------	-------------------------	--------------------------

### Velho Mundo

#### Leishmaniose Visceral

<i>L. infantum</i>	<i>Ph. ariasi</i> , <i>Ph. Perniciosus</i>	Bacia mediterrânea, Médio Oriente, África Oriental	Canídeos (cães, raposas)
	<i>Ph. argentipes</i> , <i>Ph. Martini</i>	China, Índia, Irão, Sudão, Etiópia	Homem
<i>L. donovani</i>	<i>Ph. Orientalis</i>	Quénia, Etiópia	Homem, cão?

#### Leishmaniose Cutânea

<i>L. trópica</i>	<i>Ph. Sergenti</i>	Bacia mediterrânea, Afeganistão, Índia	Homem, cão, hiraxes?
<i>L. major</i>	<i>Ph. papatasi</i> , <i>Ph. Duboscqi</i>	Médio Oriente, Sudoeste asiático, Norte de África, Índia, Paquistão	Roedores
<i>L. aethiopica</i>	<i>Ph. longipes</i> , <i>Ph. Pedifer</i>	Etiópia, Quénia	Roedores, preguiças, pequenos mamíferos Hiraxes

### Novo Mundo

#### Leishmaniose Visceral

<i>L. infantum</i> / <i>L. chagasi</i>	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. Evansi</i>	Brasil, Colômbia, Venezuela, Argentina, América Central	Canídeos (cães, raposas, chacais)
--	--	---	-----------------------------------

#### Leishmaniose Cutânea

<i>L. amazonensis</i>	<i>Lu. Flaviscutellata</i>	América do Sul, Bacia amazônica	Roedores, marsupiais
<i>L. mexicana</i>	<i>Lu. Olmeca</i>	México, sul dos E.U.A e América Central	Roedores, cão
<i>L. guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. Anduzei</i>	América do Sul	Roedores, preguiças
<i>L. panamensis</i> *	<i>Lu. Panamensis</i>	América Central	Preguiça, primatas, roedores, canídeos
<i>L. braziliensis</i> *	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. Intermédia</i>	América Central e Sul	Cão, cavalo, roedores
<i>L. peruviana</i>	<i>Lu. Peruensis</i>	Perú, Argentina, Equador	Cão, roedores

\*espécies também associadas à doença clínica de leishmaniose mucocutânea. Esta doença está normalmente associada à espécie *L. braziliensis*, existindo contudo alguns casos causados por *L. panamensis* (Dedet, 1994) e por *L. infantum* (Alvar *et al.*, 1990; Tomson *et al.*, 2002; Kharfi *et al.*, 2003; Benmously-Mlika *et al.*, 2008; Garcia de Marcos *et al.*, 2007). Adaptado de Dedet, 2000

## 1.2 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral, também conhecida por Kala-azar, é a forma mais grave da doença. As principais espécies responsáveis por esta forma clínica são: *Leishmania donovani* Laveran & Mesnil, 1903 nas regiões endémicas da Índia, China, África Oriental, nomeadamente na Etiópia e no Sudão, e *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 nas regiões da bacia mediterrânea, China, Balcãs, Ásia Central, África Oriental e América Central e do Sul.

São diagnosticados cerca de 500 000 novos casos de LV todos os anos. Sendo que, cerca de 90% dos casos diagnosticados e declarados anualmente, são reportados em zonas rurais pobres e áreas suburbanas no Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2010).

*L. infantum* atinge preferencialmente crianças com idades inferiores a 4 anos, daí o seu nome. Os seus vectores comprovados em Portugal são *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* (Pires *et al.*, 1984), sendo a transmissão zoonótica. No Novo Mundo, o seu principal vector, existente preferencialmente em zonas rurais e peridomésticas, é *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912.

*L. donovani*, existente no subcontinente indiano e África Equatorial, possui como vector dípteros do género *Phlebotomus* sp., e caracteriza-se por ter uma transmissão antroponótica.

Clinicamente, a LV manifesta-se de forma semelhante nos diferentes focos, apresentando uma tríade clínica relativamente constante: febre, hepatoesplenomegalia e hiperproteinemia (Campino, 1998). A anemia e a leucopenia são aspectos visíveis nas análises sanguíneas destes doentes. A evolução da doença é progressiva, com um período de incubação de vários meses a vários anos, podendo ser fatal, se não for tratada.

Em indivíduos imunocomprometidos, quer por infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), quer por outras causas, as manifestações clínicas atípicas são frequentes, com o

envolvimento de tecidos e órgãos que não são usualmente atingidos, tais como a pele, sangue periférico, aparelho digestivo. Adicionalmente, indivíduos infectados pelo HIV podem desenvolver uma doença visceral mesmo quando infectados por estirpes dermatrópicas (Campino *et al.*, 1997).

Em Portugal, a LV por *L. infantum* não é rara, sendo transmitida por *P. perniciosus* e *P. ariasi*. Tem como reservatório canídeos, maioritariamente o cão, sendo mais frequente nas regiões de Trás-os-Montes, grande Lisboa e Algarve [1].

**Figura 2** Distribuição mundial de Leishmaniose Visceral



Adaptado de Chappuis *et al.*, 2007

### 1.3 Leishmaniose cutânea

A LC é a forma da doença mais comum, representando 50 a 75% do total de novos casos anuais, cerca de 1.5 milhões de novos casos por ano (WHO, 2010).

Tem uma incubação de algumas semanas a alguns meses. De um modo geral, após este período, surgem sinais como nódulos, que posteriormente ulceram. Estes nódulos variam em



tamanho e aparência ao longo do tempo, podendo ser dolorosos ou não. A cura das lesões ocorre após alguns meses até dois a três anos, com formação de cicatrizes indeléveis.

Estas características clínicas não são uniformes em todas as regiões geográficas, variando com a espécie de *Leishmania* sp. envolvida e com o estado e / ou informação genética do sistema imunológico do indivíduo infectado (Campino, 1998).

### 1.3.1 Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

Caracteriza-se clinicamente por um nódulo no local da inoculação dos parasitas pelo insecto vector que ulcera e cura espontaneamente, originando cicatrizes indeléveis e despigmentação da pele.

Três principais espécies de *Leishmania* sp. são responsáveis por esta doença no Velho Mundo diferindo clínica e epidemiologicamente entre si:

- *Leishmania tropica* Wright, 1903 nos países da costa Sul e Este do Mediterrâneo e Médio Oriente, transmitida por *Phlebotomus sergenti* causa leishmaniose cutânea antroponótica sendo o reservatório principal o Homem (antroponose);

- *Leishmania major* Yakimoff & Schokor, 1914 no Norte de África, Irão, Iraque, Rússia e Afeganistão, transmitida por *Phlebotomus. papatasi* causa leishmaniose cutânea zoonótica tendo como principais reservatórios os roedores;

- *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford & Bray, 1973 na África Oriental, Etiópia e Quênia, transmitida por *Phlebotomus* sp. sendo os principais reservatórios os hiraxese e pequenos mamíferos; esta espécie é responsável por um tipo clínico de leishmaniose cutânea que pode, em alguns casos, evoluir para leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Bryceson, 1996).

No Norte de África e Sul da Europa, foram também descritos, pela primeira vez em 1985 por Belazzoug *et al.*, zimodemes dermatrópicos de *L. infantum*.



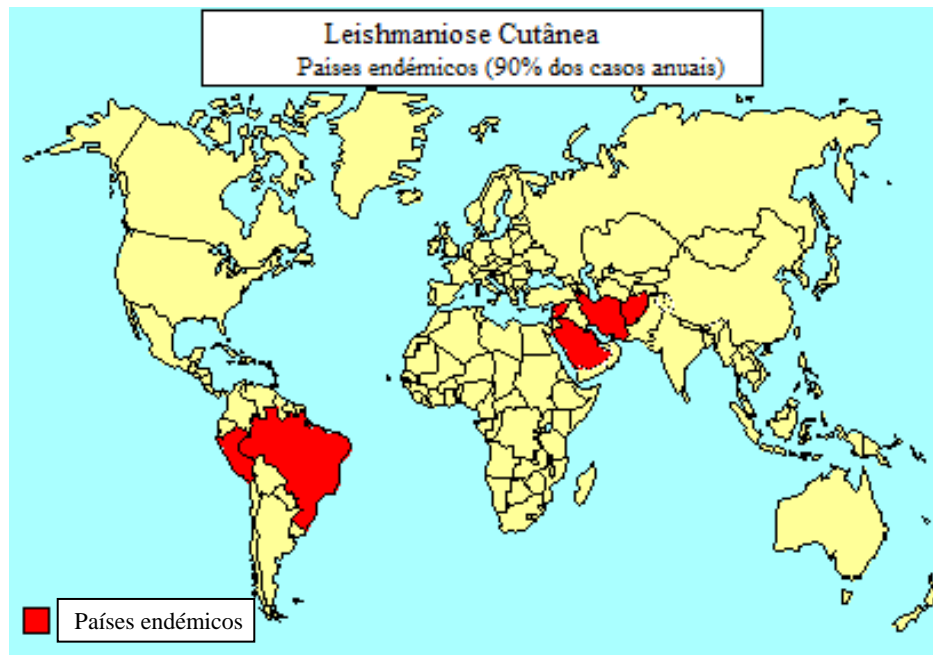
No Novo Mundo, a LCL está associada a um grande número de espécies: *Leishmania mexicana* Biagi, 1953, com distribuição no México, Sul dos EUA e América Central, *Leishmania amazonensis* Lainson & Shaw 1979, na floresta amazónica e América do Sul, *Leishmania braziliensis* Viannia, 1911 na América Central e do Sul, *Leishmania peruviana* Velez, 1913 no Peru e Argentina, *Leishmania guyanensis* Floch, 1954, na Guiana Francesa e Brasil e *Leishmania panamensis* Lainson & Shaw 1972 na América Central. Para além das espécies já mencionadas, no Brasil são ainda responsáveis pela LCL as espécies *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. lainsoni*. Esta última também encontrada no Perú.

### 1.3.2 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

As formas cutâneas difusas encontram-se mais excepcionalmente e resultam dum défice imunitário dos indivíduos infectados. A sua cura, ao contrário da LCL não é espontânea e apresenta resistência à terapêutica anti-*Leishmania*. Caracteriza-se pela disseminação das lesões iniciais após um período de meses ou anos através da corrente sanguínea para outros locais do corpo, nomeadamente, membros e face, onde confluem e formam placas (Bryceson, 1996).

*L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. amazonensis* no Novo Mundo, são as espécies responsáveis por este tipo de leishmaniose. Outras espécies como, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. chagasi* têm também sido detectadas em casos de co-infecções com o HIV (Coura *et al.*, 1987, Campino *et al.*, 1994a, Alvar *et al.*, 1996, Diehl *et al.*, 2004)

**Figura 3** Distribuição geográfica das áreas endêmicas de Leishmaniose Cutânea



Fonte: [www.who.com](http://www.who.com)

## 1.4 Leishmanioze mucocutânea

Esta forma de leishmaniose, também conhecida por “Espúndia”, existe na América Central e do Sul. Está normalmente associada à espécie *L. braziliensis*, existindo contudo alguns casos causados por *L. panamensis* (Dedet, 1993).

Inicia-se por uma lesão cutânea, em tudo semelhante à que ocorre nos casos de LCL. O que difere esta forma de leishmaniose com a LCL é um posterior envolvimento das mucosas da face por metastização secundária, levando à necrose dos tecidos moles das cartilagens nasofaríngeas, podendo originar graves mutilações faciais (Dedet&Pratlong, 2003).

## 2. O parasita

### 2.1 Morfologia

Os protozoários do género *Leishmania* apresentam duas formas morfológicas distintas no seu ciclo de vida: uma forma promastigota, no insecto vector, e uma forma amastigota, no hospedeiro vertebrado (Figura 4) (Killick-Kendrick, 1979; Sacks, 1989; Bates&Tetley, 1993).

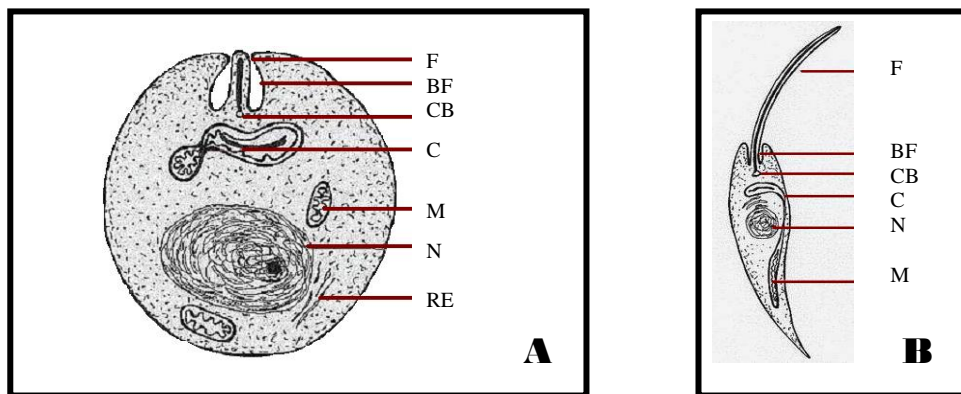
As formas amastigotas são formações ovóides ou arredondadas que medem 2,5 – 6,8 µm de comprimento (Figura 4 A). Multiplicam-se intracelularmente nas células mononucleares fagocíticas do hospedeiro vertebrado. Possuem um núcleo relativamente grande e proeminente e um flagelo não livre. Numa posição anterior ao núcleo encontra-se o cinetoplasto, organóide com dupla membrana tubular, em forma de bastonete e que contém uma quantidade significativa de DNA cinetoplastidial (kDNA).

A forma promastigota, encontrada no aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado (vector) *in vivo*, podendo também ser obtida em culturas *in vitro* a partir de tecidos parasitados de hospedeiros vertebrados, é alongada e mede 10 – 20 µm de comprimento e 1,5 – 3,0 µm de largura. O núcleo ocupa uma posição central, estando o cinetoplasto entre o núcleo e a extremidade anterior da célula. É uma forma móvel. Possui um longo flagelo livre de comprimento igual ou superior ao comprimento do corpo celular, com origem no corpo basal, que emerge na extremidade anterior da célula (Figura 4 B).

No final do século passado, foram conhecidas diferenças bioquímicas e morfológicas entre as formas promastigotas encontradas no estômago médio e as encontradas nas partes anteriores do aparelho digestivo do flebótomo infectado, tendo sido denominadas de formas procíclicas e formas metacíclicas respectivamente (Sacks&Perkins, 1984; Franke *et al*, 1985; Bates, 1994). Esta forma

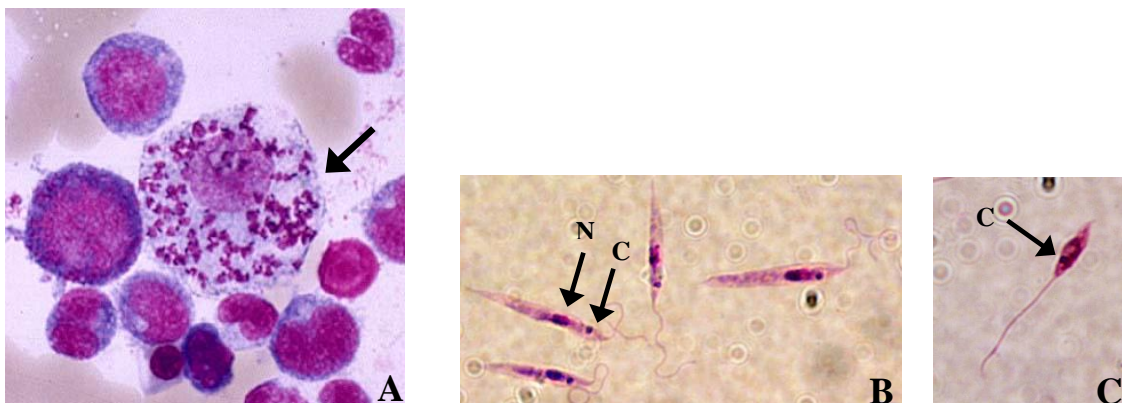
metacíclica, é uma forma promastigota com características morfológicas e bioquímicas especialmente adaptadas para a sobrevivência do parasita no hospedeiro vertebrado. Diversos estudos demonstram adaptações da forma metacíclica, nomeadamente no que diz respeito a moléculas de superfície, características bioquímicas, resistência ao soro e interação com as células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (Mallinson&Coombs, 1989). Morfologicamente, as formas promastigotas procíclicas são elipsóides e com um flagelo mais curto que o corpo celular. As formas promastigotas metacíclicas, são mais estreitas e curtas e possuem um flagelo com grande mobilidade, duas a três vezes mais comprido que o corpo celular (Figura 5).

**Figura 4** Representação esquemática das duas formas morfológicas de *Leishmania*



(A) amastigota e (B) promastigota. F. flagelo, BF. bleferoblasto, B. corpo basal, C. cinetoplasto, M. mitocôndria, N. núcleo, RE. retículo endoplasmático. (Adaptado de Sílvia Violi [www.leishmania.org](http://www.leishmania.org))

**Figura 5** Microfotografias de *Leishmania* sp



(A) formas amastigotas no interior de uma célula mononucleada (corante Wright-Leishman) (adaptado de [www.vet.uga.edu](http://www.vet.uga.edu)); (B) promastigotas procíclicas de *L. braziliensis*; (C) promastigota metacíclico de *L. infantum*. N – núcleo, C - cinetoplasto. Coloração com Giemsa. Ampliação 1000x. Fotografias da autora.

## 2.2 Ciclo de vida

*Leishmania* sp ocupa dois micro-habitats diferentes durante o seu ciclo de vida: no aparelho digestivo do flebótomo; e, intracelularmente, no hospedeiro vertebrado (Franke *et al.*, 1985).

O ciclo biológico de *Leishmania* sp. é idêntico para todas as espécies de *Leishmania* (Figura 6).

Ao efectuar a sua refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infectado, o flebótomo fêmea, responsável pela transmissão do parasita, ingere, juntamente com o sangue, macrófagos infectados com a forma amastigota de *Leishmania* sp. O sangue ingerido é envolvido pela membrana peritrófica num processo que demora cerca de 24 horas. Esta membrana protege o epitélio do estômago do conteúdo da refeição sanguínea. As formas amastigotas diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas e, após a ruptura da membrana peritrófica, fixam-se, através do flagelo, ao epitélio do estômago torácico no caso de ser um flebótomo vector do subgénero *Leishmania* ou ao epitélio do estômago abdominal no caso de ser um flebótomo vector do subgénero *Viannia*. Dá-se início a uma fase de multiplicação logarítmica em que os parasitas não são infecciosos (Sacks&Perkins, 1984). Após 4 a 5 dias, estas formas transformam-se em promastigotas metacíclicas, ficando mais estreitos e com mobilidade elevada. Aproximadamente 9 dias depois, migram para a região anterior do aparelho digestivo (válvula estemodeal), prontos a serem inoculados no hospedeiro vertebrado durante a próxima refeição sanguínea. O ciclo do parasita no insecto completa-se em 4 a 14 dias após a refeição de sangue, variando com a espécie de *Leishmania* (Killick – Kendrick, 1990).

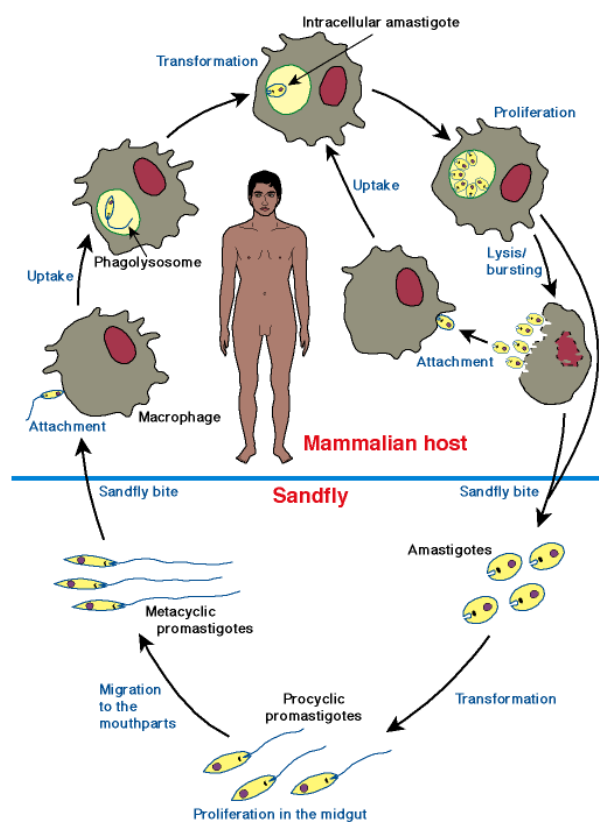
O flebótomo fêmea inocula os promastigotas metacíclicos (infecciosos), contidos na saliva, na derme do hospedeiro por regurgitação através da picada (Killick – Kendrick, 1990; Bates, 2007). No vertebrado, os promastigotas metacíclicos são rapidamente fagocitados pelos macrófagos da pele onde se transformam em amastigotas. As formas amastigotas iniciam um processo de

multiplicação activa por divisão longitudinal binária. Esta multiplicação acaba por provocar a destruição da membrana da célula hospedeira e subsequente libertação dos parasitas que vão infectar novos macrófagos.

A espécie de *Leishmania* e o estado imunitário do vertebrado infectado, determinam a localização das formas amastigotas e o decurso da infecção, isto é, a forma clínica da leishmaniose que se irá desenvolver. Na leishmaniose cutânea, os macrófagos infectados mantêm-se no tecido subcutâneo, porém, na leishmaniose visceral, invadem células do sistema mononuclear fagocítico, nomeadamente células do baço, do fígado, da medula óssea, dos gânglios e de outros órgãos linfóides (Bryceson, 1996).

O ciclo completa-se quando o vector faz uma nova refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado, ingerindo macrófagos infectados.

**Figura 6** Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* sp



Adaptado de [www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html](http://www.wehi.edu.au/research/overview/inf.html)

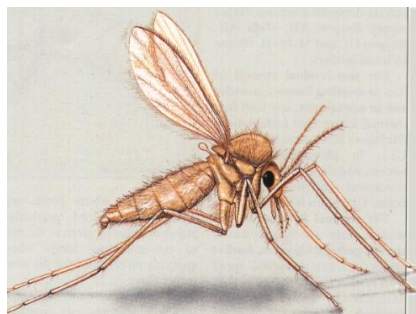
### 3. O hospedeiro

#### 3.1 Hospedeiro Invertebrado: vector

O principal agente de transmissão natural é um flebotomo da família *Psychodidae* (Dedet&Pratlong, 2003). Trata-se de um insecto díptero pequeno, com 2 a 3 mm de comprimento, capaz de passar as redes mosquiteiras normais. Caracteriza-se por possuir asas bastante pilosas e patas muito longas (Figura 7). Nos continentes europeu, asiático e africano (Velho Mundo) os vectores são espécies do género *Phlebotomus* (*Ph.*) enquanto que no continente Americano (Novo Mundo) pertencem ao género *Lutzomyia* (*Lu.*).

Apenas as fêmeas são hematófagas e transmissoras do parasita. São insectos com actividade crepuscular ou nocturna, sendo assim inactivos durante o dia. O voo nunca é mais longo que um metro, contudo, um flebótomo consegue cobrir uma área de mais de um quilómetro durante uma noite. Um flebótomo fêmea é infeccioso para um novo hospedeiro a partir de 5 a 10 dias após ter feito uma refeição sanguínea num mamífero infectado, e mantém-se infeccioso para o resto da sua vida. A infecção de um novo hospedeiro ocorre com a segunda refeição sanguínea depois de o insecto ter feito a deposição dos ovos (Dedet&Pratlong, 2003).

**Figura 7** Desenho técnico de *Phlebotomus* sp



fonte: [www.cdfound.to.it](http://www.cdfound.to.it)



### 3.2 Hospedeiro Vertebrado: reservatório

Por reservatório entende-se uma ou mais populações de hospedeiros nos quais o parasita vive e multiplica-se de maneira a que possa ser transmitido a um hospedeiro susceptível, perpetuando assim a sua sobrevivência (Pires, 2000). A maior parte das leishmanioses são zoonoses de animais silváticos ou domésticos. O homem apenas é infectado acidentalmente quando exposto ao ciclo natural de transmissão. A LV causada por *L. infantum* tem como reservatório os canídeos (cães, raposas e chacais) enquanto que na LV causada por *L. donovani*, o principal reservatório é o homem. Historicamente, pensa-se que a LV seria inicialmente uma parasitose de roedores a qual se foi adaptando a canídeos e por fim ao homem (Dedet&Pratlong, 2003)

A LC, por seu lado, evidencia uma maior variedade de espécies de reservatórios, entre eles, roedores, marsupiais, hiraxes, primatas, preguiças e outros mamíferos. Do mesmo modo que *L. donovani* para a LV, também *L. tropica* para a LC tem no Homem o seu principal reservatório.

## 4. Metaciclogénese

### 4.1 Aspectos gerais

É característica do género *Leishmania* sp. a multiplicação, como amastigota, dentro de macrófagos do seu hospedeiro vertebrado e, como promastigotas, extracelulares, no estômago do vector flebotomo. Este desenvolvimento cíclico relativamente simples com alterações morfológicas óbvias encobre o facto de, a um nível ultraestrutural, bioquímico, genético e biológico existir uma heterogeneidade considerável dentro das populações de promastigotas de *Leishmania* sp de uma dada espécie, sendo que, diferenças mais importantes são as que reflectem as variações que

acompanham o desenvolvimento sequencial dos promastigotas de um estado não infeccioso para um estado infeccioso.

Apesar de já nas décadas de 30/40 do século passado investigadores acreditarem que existia, no flebotomo, uma forma particular de promastigota adaptada à vida no hospedeiro vertebrado, só em 1979, Killick-Kendrick demonstrou existir diferenças morfológicas entre os promastigotas isolados logo após a refeição sanguínea do vector e os promastigotas existentes no estômago na altura da refeição sanguínea seguinte, contudo não correlacionou esta diferença morfológica com virulência.

Diversos estudos vieram comprovar, para a maioria das espécies de *Leishmania*, que este desenvolvimento sequencial das formas promastigotas no hospedeiro invertebrado resultava na transformação de um estado não infeccioso para um estado infeccioso (Giannini, 1974; Sacks&Perkins, 1984, 1985; Franke *et al.*, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Wozencraft&Blackwell, 1987; Howard *et al.*, 1987; Puentes *et al.*, 1988; Bates&Tetley, 1993).

As formas promastigotas obtidas durante a fase estacionária de crescimento dentro do aparelho digestivo do flebotomo ou em cultura axénica, são mais virulentas para um hospedeiro susceptível do que as formas promastigotas obtidas durante a fase logarítmica de crescimento (Sacks&Perkins, 1984; Franke *et al.*, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Sacks, 1989; Grimm *et al.*, 1991, 1992; Bates&Tetley, 1993). Killick-Kendrick (1979) e da Silva&Sacks (1987) decidiram denominar estas formas promastigotas mais virulentas de promastigotas metacíclicas, em analogia ao termo já usado para nominar estados infecciosos em invertebrados de outros hemoflagelados.

A razão do estado metacíclico só ter sido descoberto 50 anos após a descoberta do ciclo completo de transmissão do parasita resulta de, ao contrário dos estados infecciosos de outros hemoflagelados, as formas metacíclicas de *Leishmania* sp. não possuírem características morfológicas facilmente observáveis que as distingam das formas não infecciosas (Sacks, 1988). Para além das alterações morfológicas, as alterações bioquímicas e moleculares observadas nos promastigotas metacíclicos, reflectem uma adaptação a um determinado estágio do seu ciclo de vida

(Franke *et al.*, 1985; Sacks *et al.*, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998; Mallinson&Coombs 1989; Pinto-da-Silva *et al.*, 2002; Genestra *et al.*, 2004).

O processo da metaciclogénese começou então a ser alvo de numerosos estudos de modo a compreender melhor esta fase do ciclo do parasita e assim identificar e distinguir facilmente as formas promastigotas virulentas das não virulentas. Esta distinção é de extrema importância para o desenvolvimento de vacinas e para o controlo da doença.

## **4.2 Alterações morfológicas e bioquímicas dos promastigotas metacíclicos**

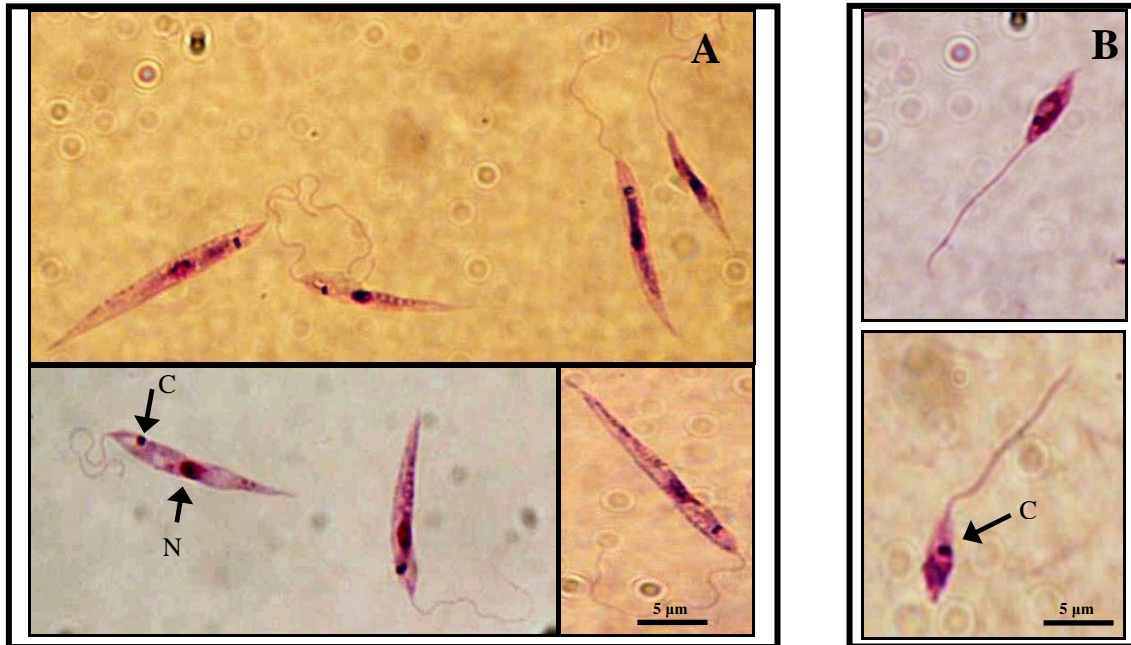
### **4.2.1 Alterações morfológicas**

Morfológicamente, as formas metacíclicas são descritas como pequenas e estreitas e com flagelo longo (duas vezes ou mais o comprimento do corpo celular), ocorrendo, *in vitro*, em maior número quando a população se encontra na fase estacionária de crescimento (Figura 8) (Sacks&Perkins, 1984; Franke *et al.*, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Sacks, 1989; Grimm *et al.*, 1991). Vários estudos demonstraram que o comprimento médio dos promastigotas metacíclicos varia entre espécies, sendo inferior a 8.5 µm para *L. mexicana* (Walters *et al.*, 1987, Bates&Tetley, 1993; Rogers *et al.*, 2002), inferior a 6.2µm para *L. braziliensis* (Almeida *et al.*, 1993) e inferior a 4.5 µm para *L. major* e *L. donovani* (Bandyopadhyay *et al.*, 1991; Howard *et al.*, 1987). Estas diferenças podem ser devido a características biológicas de cada estirpe ou a factores externos como as condições experimentais, nomeadamente o meio de cultura usado, e o número de gerações dos parasitas.

Outra alteração já demonstrada diz respeito à membrana do parasita. Na fase metacíclica do promastigota, este desenvolve uma fina camada protectora que cobre toda a membrana plasmática do corpo celular e do flagelo (Figura 9) (Bates&Tetley, 1993; Pinto-da-Silva *et al.*, 2002). O

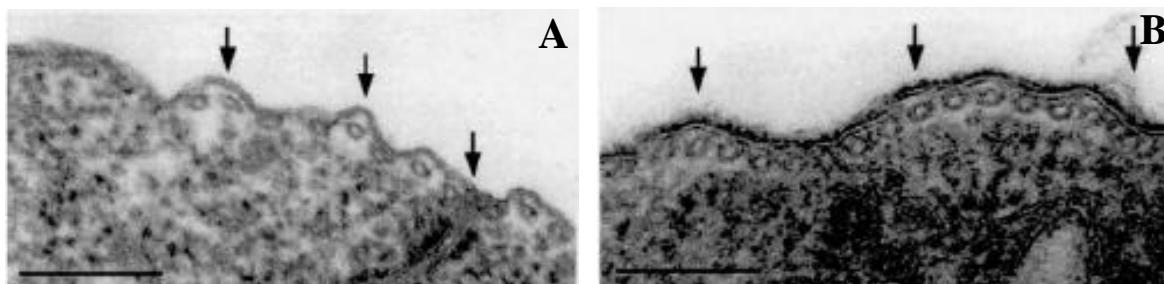
espessamento da membrana resulta de alterações bioquímicas, as quais serão explicadas no próximo ponto.

**Figura 8** Microfotografias de *L. braziliensis*



(A) forma procíclica e (B) forma metacíclica. Ampliação de 1000x . N. núcleo, C. cinetoplasto. Fotografias da autora.

**Figura 9** Microfotografias da membrana plasmática de *L. braziliensis*



(A) promastigotas procíclicos e (B) promastigotas metacíclicos. Pormenor da camada exterior à membrana plasmática em (B). A barra corresponde a 0.25 nm. (Adaptado de Pinto-da-Silva *et al.*, 2002).

#### 4.2.2 Alterações bioquímicas

Ao serem inoculados durante a refeição sanguínea do vector os promastigotas ficam sujeitos à acção citotóxica do soro do hospedeiro vertebrado devido à activação do complemento antes de serem fagocitados pelos macrófagos. A sobrevivência dos parasitas depende da sua capacidade e

rapidez para se tornarem intracelulares (Jacques Mauël, 1990; Laurenti *et al.*, 2004) e da sua resistência ao ambiente extracelular. As formas promastigotas não infecciosas activam o complemento pela ligação da fracção C3 directamente à membrana do parasita e são lisadas rapidamente (Puentes *et al.*, 1988). Contudo, quando os promastigotas metacíclicos são inoculados no hospedeiro vertebrado, sofrem alterações na membrana que resultam numa resistência à acção lítica do soro através da ligação do anticorpo (IgG ou IgM) ao antígeno parasitário, fixando o componente opsonínico C3b à superfície do parasita, evitando a lise (Puentes *et al.*, 1988; Roitt *et al.*, 1996, Pinto-da-Silva *et al.*, 2002). A fixação desta fracção do complemento é vantajosa para o parasita porque aumenta a sua interacção com os macrófagos atraindo-os ao local da infecção e facilitando o processo de fagocitose. Deste modo, os promastigotas infecciosos aproveitam os efeitos opsonínicos e quimiotáticos do complemento e ao mesmo tempo evitam os seus efeitos líticos. São exemplos de ligandos à superfície do parasita, a glicoproteína de 63 Kd (gp63), já descrita em numerosas espécies de *Leishmania*, o lipofosfoglicano (LPG) a glicoproteína de 46 kDa e proteínas de choque térmico, as quais impedem a lise do parasita quando passa do vector, a uma temperatura de cerca de +25°C, para o hospedeiro vertebrado que tem uma temperatura corporal bastante mais elevada superior a +37°C (Puentes *et al.*, 1988; Mauël, 1990).

As diferenças encontradas nas interacções de superfície entre promastigotas de *Leishmania* sp. e as células hospedeiras poderão estar relacionadas com o tipo de macrófago e com características intrínsecas do parasita (Mauël, 1990).

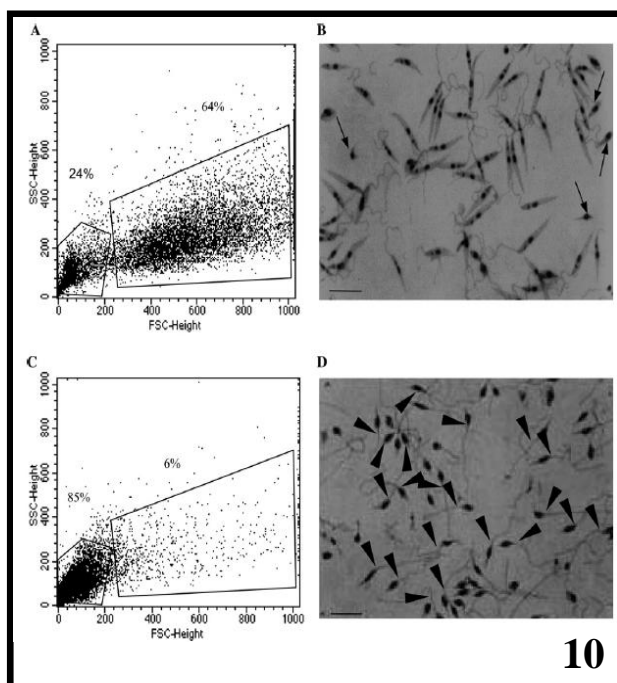
### **4.3 Isolamento de promastigotas metacíclicos**

#### **4.3.1 Critérios morfológicos**

Baseados nas modificações dos promastigotas que ocorrem durante o processo de metaciclogénese, diversos autores desenvolveram processos de isolamento de promastigotas metacíclicos, isto é, processos que separam, *in vitro*, os promastigotas virulentos dos não virulentos.

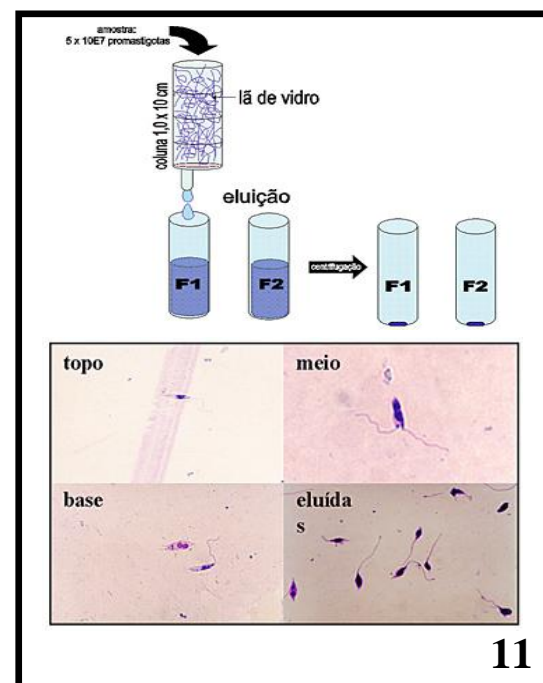
A primeira abordagem para o isolamento das formas metacíclicas explorou o facto de os promastigotas procíclicos serem morfológicamente diferentes dos metacíclicos, nomeadamente no tamanho celular e tamanho do flagelo (Killick-Kendrick, 1979). Estas diferenças são utilizadas no isolamento *in vitro* de promastigotas metacíclicos usando técnicas como a microscopia óptica (Grimm *et al.*, 1991; Bates & Tetley, 1993); a microscopia electrónica (Bates & Tetley, 1993; Pinto-da-Silva *et al.*, 2002); a citometria de fluxo (Saraiva *et al.*, 2005) (Figura 10); a cromatografia em coluna de lã de vidro (Dórea *et al.*, 2002) (Figura 11) e a separação de promastigotas por gradiente de densidade (Sacks *et al.*, 1985; Späth & Beverley, 2001). Contudo para um isolamento de promastigotas metacíclicos mais eficaz deve-se conjugar metodologias baseadas em critérios morfológicos e bioquímicos.

**Figura 10** Técnica de isolamento de promastigotas metacíclicos por citometria de fluxo



Micrografias de promastigotas de *L. amazonensis*. Análise de promastigotas na fase estacionária através de espectrofotómetro e por citometria de fluxo (A e C) e no microscópio óptico (B e D). Os parasitas foram analisados antes (A e B) e após (C e D) purificação com 3A1-La mAb dos parasitas. As setas apontam promastigotas metacíclicos numa população em fase estacionária não purificada (B) e após purificação (D). Barra corresponde a 10  $\mu$ m (Adaptado de Saraiva *et al.*, 2005);

**Figura 11** Técnica de isolamento de promastigotas metacíclicos por cromatografia em coluna de lã de vidro



Micrografias de promastigotas de *L. major* obtidas durante ou após separação por cromatografia em coluna de lã de vidro (coloração com Giemsa, 400X). A análise por Western Blotting confirmou que os parasitas encontrados na fracção eluída da coluna eram realmente promastigotas metacíclicos (adaptado de Dórea *et al.*, 2002).



#### 4.3.2 Critérios bioquímicos

As alterações bioquímicas observadas no lipofosfoglicano (LPG) durante a fase de metaciclo-génese também podem ser utilizadas para o isolamento destas formas (Saraiva *et al.*, 1995; Pinto-da-Silva *et al.*, 2002). Para *L. major* e *L. donovani*, as modificações no LPG resultam numa regulação negativa dos locais de ancoragem de lectinas. Nestas duas espécies, é possível purificar promastigotas metacíclicos por selecção negativa, isto é, as formas virulentas perdem a capacidade de serem aglutinados pela lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) e pela concanavalina A (Da Silva&Sacks, 1987; Sacks *et al.*, 1995). As formas metacíclicas *L. braziliensis* podem ser purificadas também por selecção negativa, usando a lectina *Bauhinia purpurea* (Pinto-da-Silva *et al.*, 2002) e as *L. tropica* recorrendo a um anticorpo monoclonal XCIV 1H2-A8 (T11) anti-lipofosfoglicano (LPG) (Lira *et al.*, 1998).

Mukhopadhyay *et al.* (1988), demonstrou que os promastigotas de cinco espécies de *Leishmania* apresentavam níveis superiores de actividade da proteína cinase (PKA) na fase estacionária de crescimento comparativamente à fase logarítmica. Esta diferença de actividade entre fases de crescimento variava entre as espécies, sendo mais marcada em *L. amazonensis* (Genetra *et al.*, 2004) e menos em *L. donovani* (Mukhopadhyay *et al.*, 1988).

#### 4.3.3 Resistência à acção de lise membranar do Sistema Complemento do hospedeiro

Para os promastigotas de *Leishmania* sp., inoculados pelo flébotomo no hospedeiro vertebrado, iniciarem a infecção, têm de sobreviver aos mecanismos de defesa deste último (Sacks,



1988). Estes mecanismos incluem os efeitos líticos resultantes da activação do Sistema Complemento do hospedeiro.

O Complemento é um sistema de proteínas activadas por clivagem em cascata e é um dos principais mecanismos extracelulares de combate inicial a agentes externos. Quando a fase promastigota procíclica de *Leishmania* sp. se transforma na forma metacíclica infecciosa e invade o hospedeiro vertebrado, esta sofre alterações na membrana que são capazes de impedir a inserção do complexo C5b-C9 do sistema complemento do hospedeiro (Puentes *et al.*, 1990). Esta modificação na membrana ocorre principalmente através do alongamento na estrutura do lipofosfoglicano (LPG) (McConville *et al.*, 1992). As moléculas C3b e C3bi actuam ainda, na opsonização do parasita, facilitando a fagocitose por meio de ligação destas moléculas aos receptores do sistema complemento CR3 e CR1 presentes nas células do hospedeiro. A ligação aos receptores do complemento não activa os mecanismos oxidativos microbicidas do fagócito (Wright&Siverstein, 1983) e facilita a entrada do parasita na célula-alvo.

Utilizando um modelo de infecção de *L. (L.) amazonensis* em camundongos da linhagem BALB/c, Laurenti e colaboradores (2004) demonstraram que o sistema Complemento exerce um importante controle na parasitemia, já que em camundongos nos quais o sistema Complemento foi depletado pela administração de proteína de veneno de cobra (CVF), uma C3 convertase, se verificou uma queda significativa da resposta inflamatória com aumento expressivo da quantidade de parasitas.

Após escaparem da acção da lise mediada pelo sistema Complemento, os promastigotas de *Leishmania* sp. devem invadir rapidamente a célula-alvo e iniciar a fase intracelular da infecção.

Em suma, a resistência ao Sistema Complemento presente no soro do hospedeiro é uma característica essencial à sobrevivência do parasita no interior do hospedeiro. As alterações bioquímicas das moléculas de superfície do parasita são fundamentais para a preparação do mesmo ao ambiente do hospedeiro. Em contraste com as formas metacíclicas dos tripanossomas africanos e de *Trypanosoma cruzi*, os quais asseguram a resistência ao soro por uma regulação negativa da

activação do complemento nas suas superfícies, os promastigotas metacíclicos de *Leishmania* sp activam propositadamente e eficazmente o Complemento. Esta característica dos parasitas do género *Leishmania* pode ser o evento chave que os estabelece como parasitas intracelulares (Sacks, 1989).

Vários estudos demonstraram, para diferentes espécies de *Leishmania*, existir uma relação entre a fase de crescimento e a resistência ao Complemento (presente no soro do hospedeiro), sendo que esta última aumenta na fase estacionária, correspondendo a um aumento da virulência do parasita (Franke *et al.*, 1985; Sacks&Da Silva, 1987; Puentes *et al.*, 1988, Sacks *et al.* 1985, 1990; Grimm *et al.* 1991). Franke *et al.* (1985) demonstrou que a resistência dos promastigotas à lise pelo soro atinge o seu máximo na fase estacionária, quando os promastigotas assumem a aparência de metacíclicos. Esta descoberta sugere que a resistência ao soro poderá servir como um parâmetro adequado para avaliar a virulência dos parasitas (Grimm *et al.*, 1991; Puentes *et al.*, 1988).

# Capítulo II

## MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com o objectivo principal e com os objectivos específicos do estudo desenvolveram-se três protocolos metodológicos laboratoriais; um para o estudo da curva de crescimento, um para o estudo morfológico dos promastigotas ao longo da sua curva de crescimento e um para a análise do teste da lise das formas promastigotas pelo Complemento como método de isolamento de formas metacíclicas.

## 1. Estudo da curva de crescimento

### 1.1 Objecto de estudo – Parasitas

No estudo de determinação das curvas de crescimento dos parasitas foram analisadas três estirpes *L. infantum* (MHOM/PT/1988/IMT151, MHOM/PT/2000/IMT260 e MCAN/PT/2000/IMT373), duas *L. braziliensis* (1794 MHOM/VE/1984/CJ (V-3) e MHOM/PE/94/LC2452 - clone) e uma *L. peruviana* (MCAN/PE/95/HR78 clone 8).

As estirpes *L. infantum* foram isoladas em Portugal, a partir de canídeos.

As estirpes *L. braziliensis* e *L. peruviana* foram gentilmente cedidas pela Doutora I. Maurício (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, UK) e pela Doutora Elisa Cupolillo (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil).

Todas as estirpes apresentavam mais de dez passagens por meio de cultura, sendo por isso, consideradas avirulentas (Santos-Gomes, 1995).

Quando recebidos, os parasitas vinham em meio líquido de cultura de alto rendimento: Schneider (anexo 1.1), à excepção do clone HR78 cl8 que vinha em Meio  $\alpha$ -MEM (Alpha Minimum Essential Medium) (anexo 1.2). Ambos os meios foram suplementados com 20% de Soro

Fetal Bovino (FCS) (BioWhittaker) inativado a 56°C durante 30 minutos. As culturas foram incubadas numa estufa refrigerada a 24°C.

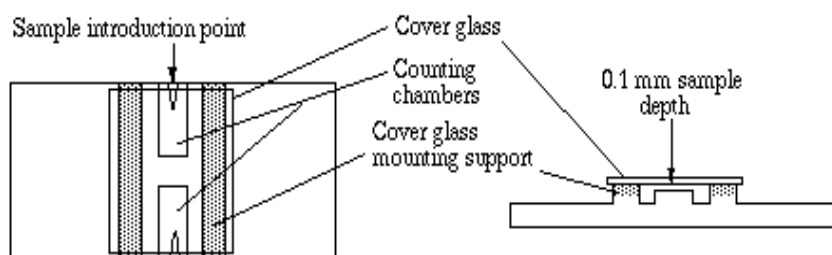
## 1.2 Preparação das culturas axénicas

O desenvolvimento das culturas foi acompanhado, determinando-se, bisemanalmente, a concentração de parasitas por contagem, em duplicado, dos promastigotas numa câmara de contagem de Neubauer até se atingir a concentração necessária para iniciar o estudo de crescimento ( $> 1 \times 10^7$  prom/ml). Sempre que necessário, procedia-se à adição de meio de cultura. Todo este procedimento foi sempre efectuado em ambiente estéril, recorrendo, para isso, a uma câmara de fluxo laminar vertical.

Procedimento da contagem de promastigotas em cultura axénica:

1. No interior da câmara de fluxo, pipetou-se 10 µl de cultura e encheu-se um dos lados do hemacitómetro de Neubauer. Repetiu-se para o outro poço de modo a obter um duplicado (Figura 12);

**Figura 12** Representação esquemática do hemacitómetro de Neubauer

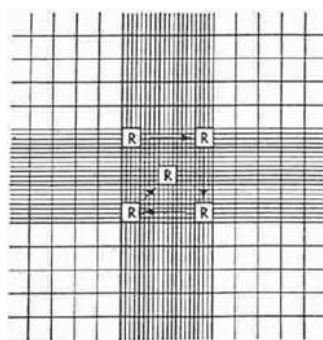


Fonte: [www.animal.ufl.edu](http://www.animal.ufl.edu)

2. Com a ajuda de um microscópio óptico, contaram-se os dois poços da câmara de Neubauer do modo representado na Figura 13. Os promastigotas procíclicos e metacíclicos foram contabilizados usando os caracteres morfológicos que os

diferenciam (Sacks&Perkins, 1984; Grimm *et al.*, 1991; Bates&Tetley, 1993; Almeida *et al.*, 1993).

**Figura 13** Representação da câmara de contagem do hemacitómetro de Neubauer



Fonte: [www.animal.ufl.edu](http://www.animal.ufl.edu)

3. Aplicou-se a seguinte fórmula para o cálculo da concentração de parasitas:

$$[\text{Parasitas}] = [(C1 + C2) / 2] \times 10 \times \text{factor de diluição}$$

C1 = primeira contagem













C2 = segunda contagem

Uma vez obtida a concentração de parasitas suficiente (superior a  $1 \times 10^7$  promastigotas/ml) deu-se início ao estudo da curva de crescimento. Retirou-se de cada cultura a quantidade necessária de líquido para obter uma concentração de  $1 \times 10^5$  prom /ml em 10 ml de meio de cultura. Centrifugou-se e procedeu-se a duas lavagens com PBS. Cada estirpe foi recolocada em novos frascos de cultura estéreis de 25ml. Por cada estirpe foram realizadas quatro culturas em meio de cultura Schneider (A, B, C, D) e quatro em meio de cultura Grace (E, F, G, H) com 10 ml de meio em cada (Figura 14).

A escolha dos meios de cultura a comparar neste estudo, meio de cultura Schneider e meio de cultura Grace (Anexo 1.3), deveu-se ao facto de estes serem os meios de cultura mais em uso no laboratório da Unidade de Leishmanioses do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa.

O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5.5 usando 1M de HCL ou 1M de NaOH conforme necessário, de forma a induzir o processo da metaciclogênese (Bates&Tetley, 1993; Zakai *et al.*, 1998).

**Figura 14** Representação esquemática das culturas das estirpes no estudo de crescimento

Estirpe	Frascos de cultura	
	Meio de cultura Schneider	Meio de cultura Grace
<i>L. infantum</i> IMT151	 A , B, C, D	 E, F, G, H
<i>L. infantum</i> IMT260	 A , B, C, D	 E, F, G, H
<i>L. infantum</i> IMT373	 A , B, C, D	 E, F, G, H
<i>L. braziliensis</i> 1794	 A , B, C, D	 E, F, G, H
<i>L. braziliensis</i> LC2452c18	 A , B, C, D	 E, F, G, H
<i>L. peruviana</i> HK78c18	 A , B, C, D	 E, F, G, H

Procedeu-se a uma contagem diária dos parasitas sem acrescentar meio às culturas e até à morte de todos os parasitas. Em cada contagem foram contabilizadas as formas promastigotas procíclicas e as formas promastigotas metacíclicas. Estas últimas foram diferenciadas morfológicamente das formas procíclicas de acordo com a descrição já feita por diversos autores – “As formas metacíclicas são pequenas e estreitas e com flagelo longo (duas vezes ou mais o comprimento do corpo celular), ocorrendo, *in vitro*, em maior número quando a população se encontra na fase estacionária de crescimento” (Sacks&Perkins, 1984; Franke *et al.*, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Sacks, 1989; Grimm *et al.*, 1991).



## 2 Análise morfológica

### 2.1 Objecto de estudo – Parasitas

No estudo morfológico dos parasitas foram analisadas duas estirpes *L. infantum*, IMT260 e IMT373, uma *L. braziliensis*, 1794 e uma *L. peruviana*, HR78cl8.

Para além da cinética de crescimento, analisou-se ainda as alterações morfológicas dos promastigotas em cultura ao longo do tempo. Para tal, foram feitos esfregaços de cada cultura, corados com Giemsa, para posterior análise em objectiva de imersão (ampliação de 1000x) de um microscópio óptico Olympus BX-51 equipado com material fotográfico e com o software DP-soft Olympus, o qual permite medir os parasitas.

Os esfregaços foram realizados tendo em conta as duas fases de crescimento de *Leishmania* sp. Foram realizados 3 esfregaços durante a fase logarítmica e 3 durante a fase estacionária. Na fase logarítmica, o primeiro esfregaço foi preparado a partir da cultura no primeiro dia, o segundo no terceiro dia de cultura e o terceiro no quinto dia (estes dias foram escolhidos baseados nos resultados de um estudo piloto que mostrou que a fase logarítmica tem a duração de cerca de 5 dias). Na fase estacionária, o primeiro esfregaço corresponde ao primeiro dia em que a concentração de promastigotas em cultura se mantém, o segundo e o terceiro esfregaço correspondem, respectivamente, a dois e quatro dias após o primeiro esfregaço. Contudo, o número de esfregaços variou com a estirpe, tendo-se adaptado o número de esfregaços à cinética de crescimento que cada estirpe ia apresentando. Assim, nas estirpes com maior tempo de duração de fase, quer logarítmica, quer estacionária, foram realizados mais esfregaços que os estipulados inicialmente de modo a que, o intervalo entre esfregaços fosse, no máximo, três dias.

Foi utilizado o programa DP-soft da Olympus para a medição dos parasitas. O comprimento do corpo celular foi medido para um mínimo de 25 promastigotas, seleccionados aleatoriamente, por cada lâmina, isto é, 100 parasitas por estirpe em cada meio de cultura. Foi medido o corpo celular do promastigota longitudinalmente desde a extremidade posterior até à base de ancoragem do flagelo (Figura 15 A).

**Figura 15** Promastigotas de *Leishmania* sp em cultura



(A) Promastigotas procíclicos de *L. braziliensis* 1794. Medição do corpo celular do promastigota com o programa DP-soft da Olympus. (B) Promastigotas procíclico *L. braziliensis* 1794. Pormenor. (C) Promastigota metacíclico *L. Infantum* IMT260. Ampliação de 1000x. Barra preta equivale a 10 µm. Fotografias da autora.

Morfológicamente, as formas metacíclicas são descritas como pequenas e estreitas e com flagelo longo (duas vezes ou mais o comprimento do corpo celular), ocorrendo, *in vitro*, em maior número quando a população se encontra na fase estacionária de crescimento (Figura 15 B e C) (Sacks&Perkins, 1984; Franke *et al.*, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Sacks, 1989; Grimm *et al.*, 1991)

## 2.2 Teste de lise pelo complemento

A fim de analisar a população das formas promastigotas metacíclicas, recorreu-se ao teste da lise pelo Complemento com soro normal (Louassini *et al.*, 1998). O teste foi realizado, para cada cultura, em duplicado, isto é, uma vez durante a fase logarítmica (quando a população de promastigotas atingiu a concentração de  $2 \times 10^7$  prom/ml (Almeida *et al.*, 1993) e uma segunda vez

durante a fase estacionária de crescimento (no dia seguinte ao dia em que esta fase era atingida, isto é, no segundo dia em que a concentração dos parasitas se manteve semelhante).

A sobrevivência dos parasitas depende da sua capacidade e rapidez para se tornarem intracelulares (Jacques Mauël, 1990; Laurenti *et al.*, 2004) e da sua resistência ao ambiente extracelular. As formas promastigotas não infecciosas activam o complemento pela ligação da fracção C3 directamente à membrana do parasita e são lisadas rapidamente (Puentes *et al.*, 1990). Contudo, quando os promastigotas metacíclicos são inoculados no hospedeiro vertebrado, sofrem alterações na membrana que resultam numa resistência à acção lítica do soro através da ligação do anticorpo (IgG ou IgM) ao antígeno parasitário

Franke *et al.* (1985) demonstrou que a resistência dos promastigotas à lise pelo soro atinge o seu máximo na fase estacionária, quando os promastigotas assumem a aparência de metacíclicos. Esta descoberta sugere que a resistência ao soro poderá servir como um parâmetro adequado para avaliar a virulência dos promastigotas.

O protocolo do teste da lise pelo Complemento foi optimizado durante este estudo. Sendo que o protocolo final detalhado desta técnica apresenta-se de seguida:

### **Protocolo do teste da lise pelo Complemento:**

(protocolo para uma amostra)

1. Retirar o volume necessário das culturas para obter  $[2 \times 10^6]$  prom/ml;
2. Centrifugar 10min a 3000 rpm;
3. Lavar duas vezes em PBS;
4. Ressuspender em 1 ml de tampão Veronal + BSA 1%;
5. Colocar 200 µl de soro não diluído no primeiro poço de uma placa de Elisa, de 96 poços, com fundos em U;
6. Colocar 100 µl de tampão Veronal + BSA 1% em todos os poços (exceptuando no primeiro);

7. Pipetar 100 µl de soro<sup>1</sup> do primeiro poço e colocar no seguinte.
8. Repetir o passo 7 fazendo as diluições seriadas 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128;
9. Colocar 100 µl de promastigotas  $2 \times 10^6$ , ressuspensos anteriormente em 1 ml de tampão Veronal + BSA 1%, em cada um dos poços, homogeneizando com a pipeta;
10. Cobrir a placa com parafilme;
11. Incubar a 37° C durante uma hora;
12. Colocar a placa em gelo durante 10 min;
13. Adicionar ao poço do controlo negativo 40 µl de 50mM EDTA + 40 µl de 50mM EGTA;
14. Contar num hemocitómetro com ajuda de um microscópio óptico, os promastigotas vivos (movimento do flagelo);
15. Realizar um esfregaço, com a ajuda de uma lâmina, de cada um dos poços;
16. Fixar as lâminas em metanol (cobrir o esfregaço com o metanol e deixar secar ao ar);
17. Corar as lâminas com Giemsa (cobrir as lâminas com Giemsa; aguardar 20 min; passar por água corrente);
18. Observar as lâminas ao microscópio fazendo medições dos organismos (25 medições por lâmina).

Controlos positivos: - 100 µl Tampão Veronal c/ BSA 1% + 100 µl de cultura de promastigotas.

- 100 µl soro + 100 µl de cultura de promastigotas

Controlos negativos: - 100 µl (Tampão Veronal c/ BSA 1% + soro inativado) + 100 µl promastigotas;

- 100 µl tampão veronal + 100 µl promastigotas + 40 µl de 50mM EDTA + 40 µl de 50mM EGTA.

---

<sup>1</sup> O soro foi gentilmente cedido por investigadores da Unidade de Leishmaniose do IHMT em colheita de sangue.

### 3 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi efectuada utilizando o programa estatístico “Statistical Package for Social Sciences” versão 16.0 (SPSS®). Sempre que necessário foram utilizados os seguintes testes: Teste T para duas amostras independentes, Teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes, Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn. Em todos estes testes estatísticos foi utilizado o nível de significância de 5%.

## **Capítulo III**

### **RESULTADOS**

## 1. Estudo de crescimento das estirpes

O clone HR78cl8 de *L. peruviana* e a estirpe IMT260 de *L. infantum* não se adaptaram ao meio de cultura Grace e portanto não serão analisadas para este meio.

### 1.1 Curvas de crescimento

Foram acompanhadas diariamente seis culturas axénicas, duas *L. braziliensis* (1794 e LC2452cl8), três *L. infantum* (IMT151, IMT260 e IMT373) e uma *L. peruviana* (HR78cl8) de forma a ser possível, no final, obter uma curva de crescimento para cada estirpe, isto é, a cinética e a concentração dos parasitas em função do tempo. Torna-se pertinente distinguir aqui os termos considerados nesta dissertação como “cinética de crescimento” e “perfil de crescimento”. Assim, neste trabalho, entendeu-se “cinética de crescimento” como a forma da curva de crescimento dos promastigotas em cultura ao longo do tempo sendo que o “perfil de crescimento” engloba a cinética de crescimento e também a variável densidade parasitária.

O crescimento foi estudado em dois meios de cultura, Schneider e Grace, ambos suplementados com 10% de FBS e pH de 5.5. Cada cultura foi feita em quaduplicado. Os valores apresentados para cada estirpe em cada um dos meios de cultura são sempre valores médios das quatro réplicas.

Relativamente à cinética de crescimento em meio de cultura Schneider, todas as estirpes revelaram um comportamento semelhante, ainda que *L. peruviana* e *L. infantum* IMT 260 tenham apresentado um desvio para a esquerda do pico da curva de crescimento, isto é, uma fase logarítmica mais curta (Figura 16 A). No meio de cultura Grace, a cinética de crescimento também



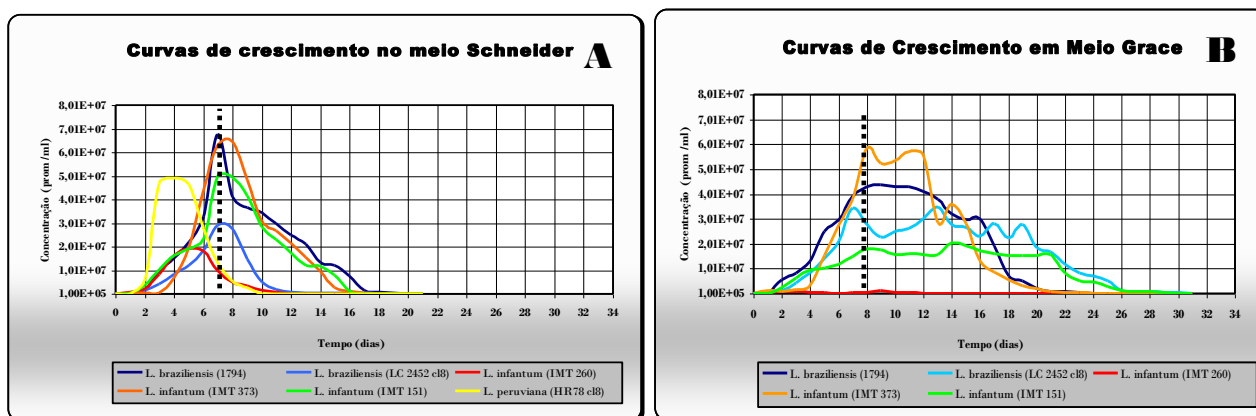
se revelou semelhante entre as estirpes, com uma fase logarítmica com a duração de seis dias e uma fase estacionária longa, comparativamente com as mesmas estirpes em meio Schneider (Figura 16 B).

Comparando as curvas de crescimento nos dois meios de cultura, todas as estirpes apresentaram cinéticas de crescimento com ambas as fases, logarítmica e estacionária, mais curtas em meio de cultura Schneider em comparação com as mesmas culturas em meio Grace.

O início da fase logarítmica ocorreu entre o 2º e o 3º dia para todas as estirpes nos dois meios de cultura, o que significa que as estirpes apresentaram um período de adaptação de 2 a 3 dias em qualquer dos meios.

Relativamente à fase estacionária, verificou-se, para todas as estirpes, uma duração de dois dias no meio de cultura Schneider e de quatro ou mais no meio Grace. No meio Schneider, esta fase foi atingida pela maioria das estirpes ao 7º dia de cultura. Excepções foram *L. peruviana* HR78cl8 e *L. infantum* IMT260 que atingiram ao 4º e 5º dia, respectivamente. Em meio Grace, a maioria das estirpes atingiu a fase estacionária ao 8º dia.

**Figura 16** Curvas de crescimento dos promastigotas em meio Schneider (A) e em meio Grace (B).



As curvas representadas correspondem a uma curva média resultante de quatro contagens independentes. Temperatura de 24°C.

As culturas *L. braziliensis* 1794 e *L. infantum* IMT373 foram, para ambos os meios de cultura, as que atingiram maiores densidades parasitárias.

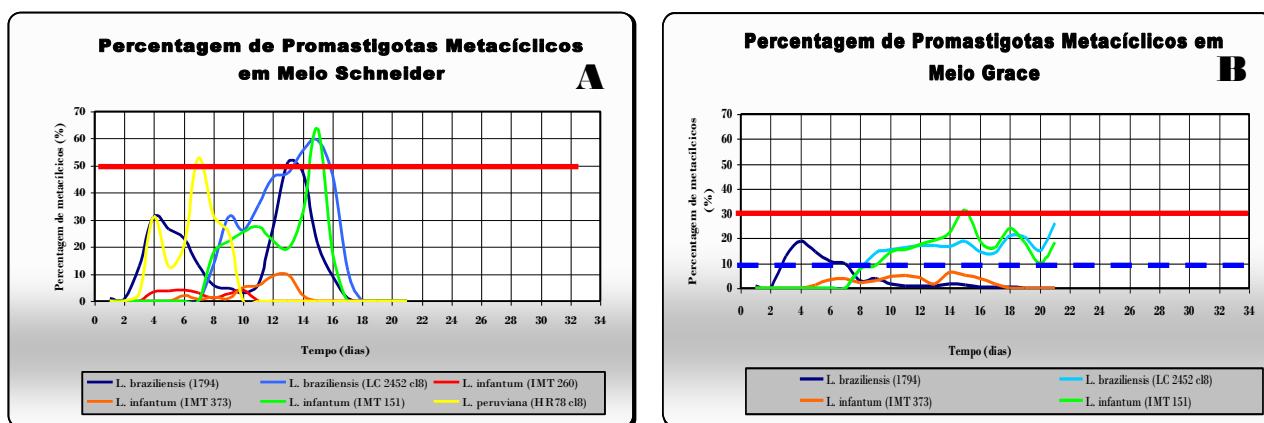
Na generalidade, as culturas em estudo atingiram maiores concentrações de promastigotas em meio Schneider em comparação com as mesmas culturas em meio Grace. Excepção a este facto foi a estirpe LC2452cl8 (*L. braziliensis*) que atingiu uma concentração parasitária máxima superior no meio Grace.

## 1.2 Metaciclogénese

A cinética do processo de metaciclogénese, bem como o perfil, expresso em percentagem de formas promastigotas metacíclicas<sup>2</sup> num total de promastigotas em cultura, foram também estudados para as mesmas estirpes.

Observou-se uma variação da percentagem de formas metacíclicas nas culturas de cada estirpe ao longo do tempo.

**Figura 17** Variação da percentagem de promastigotas metacíclicos de cada estirpe em cultura em meio Schneider (A) e em meio Grace (B),



As curvas representadas correspondem a uma curva média resultante de quatro contagens independentes. Temperatura de 24°C.

No meio de cultura Schneider, obteve-se uma cinética da percentagem de formas metacíclicas semelhante para a generalidade das estirpes estudadas. Embora com tempos diferentes, todas as estirpes apresentaram uma curva com dois picos na percentagem de formas metacíclicas, o

<sup>2</sup> As formas metacíclicas dos promastigotas foram identificadas segundo os critérios morfológicos, observados ao microscópio óptico, descritos no ponto 2.1 do capítulo II – Material e Métodos

primeiro mais pequeno e um segundo mais elevado (Figura 17A). Excepção foi a estirpe IMT260 de *L. infantum* que não apresentou uma marcada variação da percentagem das formas metacíclicas ao longo do tempo.

Foi também no meio Schneider, que as culturas de cada estirpe, apresentaram valores mais elevados da percentagem de formas metacíclicas, tendo mesmo quatro delas ultrapassado os 50% de todas as formas promastigotas em cultura, *L. braziliensis* LC2452cl8 e *L. braziliensis* 1794, *L. peruviana* HR78cl8 e *L. infantum* IMT151.

Comparando a curva de crescimento e a curva da variação da percentagem de promastigotas metacíclicos no mesmo meio de cultura - Schneider (Figura 16 A e Figura 17 A), verifica-se que a fase estacionária da curva de crescimento, onde se observam as densidades parasitárias mais elevadas, não corresponde às percentagens mais elevadas de formas metacíclicas da mesma cultura, aparecendo estas sempre num período mais tardio correspondente à fase de declínio da curva de crescimento.

A maioria das estirpes em estudo apresentou ambos os picos da curva de percentagem das formas metacíclicas em cultura numa data correspondente à fase de declínio na curva de crescimento das mesmas. Excepção foi o primeiro pico da curva de percentagem de metacíclicos de *L. peruviana* HR78cl8 e *L. braziliensis* 1794. Estas estirpes apresentaram o primeiro pico de percentagem de formas metacíclicas em cultura mais cedo (4º dia). Analisando estes resultados e a curva de crescimento obtida para cada uma destas espécies (Figura 16 A), observa-se que este primeiro pico na curva de percentagem de formas metacíclicas corresponde ao início da fase estacionária para *L. peruviana* e à fase logarítmica para *L. braziliensis* 1794. Contudo, em semelhança com as restantes estirpes, o segundo, e mais elevado, pico da curva de percentagem de formas metacíclicas em cultura destas duas estirpes corresponde à fase de declínio da curva de crescimento das mesmas.

*L. braziliensis* LC2452cl8 e *L. infantum* IMT151 foram as estirpes a apresentar culturas com a percentagem mais elevada de formas metacíclicas, 58%, ambas ao 15º dia. *L. peruviana* e *L.*

*braziliensis* 1794, também atingiram uma percentagem de formas metacíclicas superior a 50% (52%), ao 7º e ao 13º dia, respectivamente. *L. infantum* IMT260 e IMT373 não apresentaram culturas com elevadas percentagens de formas metacíclicas, atingindo só os 10% no caso de IMT373 e os 5% em IMT260. (Figura 17A).

Relativamente ao meio de cultura Grace, não se observou uma cinética da curva de percentagem de formas metacíclicas em cultura semelhante entre as estirpes em estudo, nem elevadas percentagens de formas metacíclicas, ficando todas as curvas, com excepção de *L. infantum* IMT151, abaixo dos 30% (Figura 17 B).

Tal como no meio de cultura Schneider, *L. braziliensis* 1794 apresentou, também em meio Grace, um pico na curva de percentagem de promastigotas metacíclicos em cultura muito precoce (4º dia) correspondente à fase logarítmica da curva de crescimento. Contudo, no meio de cultura Grace este pico foi de 20% de formas metacíclicas ao contrário dos 42% em meio Schneider. Todas as outras estirpes em estudo apresentaram as maiores percentagens de formas metacíclicas em cultura numa data correspondente ao final da fase estacionária da curva de crescimento das mesmas (Figura 16 B e Figura 17 B).

*L. braziliensis* LC2452cl8 e *L. infantum* IMT151 atingiram no 10º dia um patamar de formas metacíclicas que oscilou entre os 10 e os 30% até ao final do estudo (21º dia), sendo assim as duas estirpes em estudo que apresentaram culturas, em meio de Grace, com percentagens mais elevadas de formas metacíclicas e durante mais tempo.

## 2. Estudo Morfológico

Neste estudo, simultaneamente com a análise da cinética de crescimento, foi elaborada uma análise morfológica. Esta última consistiu na medição do comprimento do corpo celular de uma amostra aleatória de promastigotas em cultura para cada estirpe. Este comprimento foi tratado como variável dependente, sendo as variáveis independentes a estirpe, o meio de cultura e a fase de crescimento dos promastigotas. Os resultados foram analisados usando o programa SPSS como já descrito no capítulo Materiais e Métodos. Foram analisadas as estirpes *L. braziliensis* 1794, *L. peruviana* HR78 cl8 e *L. infantum* (IMT260 e IMT373).

### 2.1 Comprimento do corpo celular dos promastigotas em relação à estirpe

Numa primeira análise aos dados começou por se considerar uma única variável independente – a estirpe – a fim de verificar se esta é independente ou dependente da variável “comprimento celular dos promastigotas” (variável dependente), independentemente do meio de cultura ou da fase de crescimento da cultura.

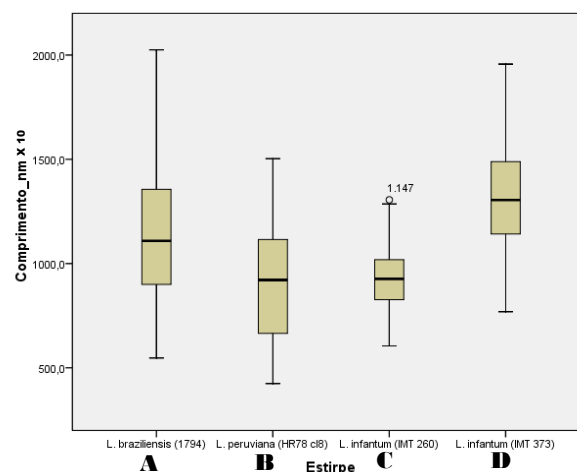
As quatro estirpes em estudo apresentaram valores médios do comprimento do corpo celular dos promastigotas diferentes entre si (Quadro 2, Figura 18). As estirpes *L. peruviana* e *L. infantum* IMT260 foram as que apresentaram a média do comprimento dos parasitas mais semelhante entre si. *L. peruviana* foi a estirpe que apresentou o tamanho médio de parasita mais baixo (9,30  $\mu\text{m}$ ) e *L. infantum* IMT373 o mais elevado (13,19  $\mu\text{m}$ ). Analisando a amplitude do valor médio do comprimento dos promastigotas de cada estirpe, observou-se uma grande diferença entre estirpes, variando desde 7,01  $\mu\text{m}$  para *L. infantum* IMT260 a 14,78  $\mu\text{m}$  para *L. braziliensis* 1794.

**Quadro 2** Valores da média do comprimento do corpo celular dos promastigotas de cada estirpe

Estirpe (variável independente)	N	Mínimo ( $\mu\text{m}$ )	Máximo ( $\mu\text{m}$ )	Média ( $\mu\text{m}$ )	Desvio Padrão
<i>L. braziliensis</i> 1794	516	5,47	20,25	<b>11,43</b>	2,99
<i>L. peruviana</i> HR78cl8	267	4,25	15,03	<b>8,99</b>	2,58
<i>L. infantum</i> IMT260	524	6,05	13,06	<b>9,30</b>	1,44
<i>L. infantum</i> IMT373	504	7,69	19,57	<b>13,19</b>	2,34

N - número de promastigotas medidos aleatoriamente.

Os resultados apresentados são as médias de oito contagens independentes. Em cada contagem /lâmina foram medidos, aleatoriamente, pelo menos cinquenta promastigotas.

**Figura 18** Distribuição dos comprimentos dos promastigotas em relação à estirpe

(A) *L. braziliensis* 1794, (B) *L. peruviana* HR78cl8, (C) *L. infantum* IMT260 e (D) *L. infantum* IMT373

Os resultados apresentados são as médias de oito contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, cinquenta promastigotas.

Da análise estatística efectuada, não se verificou o pressuposto da normalidade nem o da homogeneidade de variâncias para todas as estirpes ( $p < 0.05$ ) para a distribuição da variável dependente comprimento do corpo celular dos promastigotas com o factor “estirpe”, tendo sido, por isso, necessário recorrer a testes não paramétricos de inferência estatística – teste de Kruskal – Wallis – a fim de verificar a igualdade das medianas do comprimento de corpo celular dos promastigotas das quatro estirpes em estudo. Este teste mostrou não haver igualdade de medianas

dos comprimentos dos promastigotas entre as quatro estirpes ( $p < 0.05$ ). Contudo, este teste só nos diz que há pelo menos uma mediana do comprimento do corpo celular dos promastigotas diferente entre as quatro estirpes. Assim, aplicou-se um teste *à posteriori* – Teste de Dunn, que demonstrou que as medianas do comprimento do corpo celular dos promastigotas das estirpes *L. peruviana* e *L. infantum* IMT260 são as únicas que são significativamente semelhantes entre si ( $p > 0.05$ ).

## 2.2 Comprimento do corpo celular dos promastigotas em relação ao meio de cultura

Um dos objectivos deste trabalho foi estudar a variação do comprimento dos promastigotas em dois meios de cultura diferentes, meio Schneider e meio Grace. Os resultados obtidos estão representados no Quadro 3 e na Figura 19.

**Quadro 3** Distribuição do comprimento do corpo celular dos promastigotas por estirpe e por meio de cultura

Estirpe	Meio de cultura	N	Mínimo ( $\mu\text{m}$ )	Máximo ( $\mu\text{m}$ )	Média ( $\mu\text{m}$ )
<i>L. braziliensis</i> (1794)	Schneider	263	6,06	17,82	<b>11,30</b>
	Grace	253	5,47	20,25	<b>11,57</b>
<i>L. infantum</i> (IMT260)	Schneider	256	6,20	12,86	<b>9,28</b>
	Grace	268	6,05	13,06	<b>9,31</b>
<i>L. infantum</i> (IMT373)	Schneider	242	8,27	19,57	<b>12,94</b>
	Grace	262	7,69	18,69	<b>13,43</b>

N – número de promastigotas medidos, seleccionados aleatoriamente

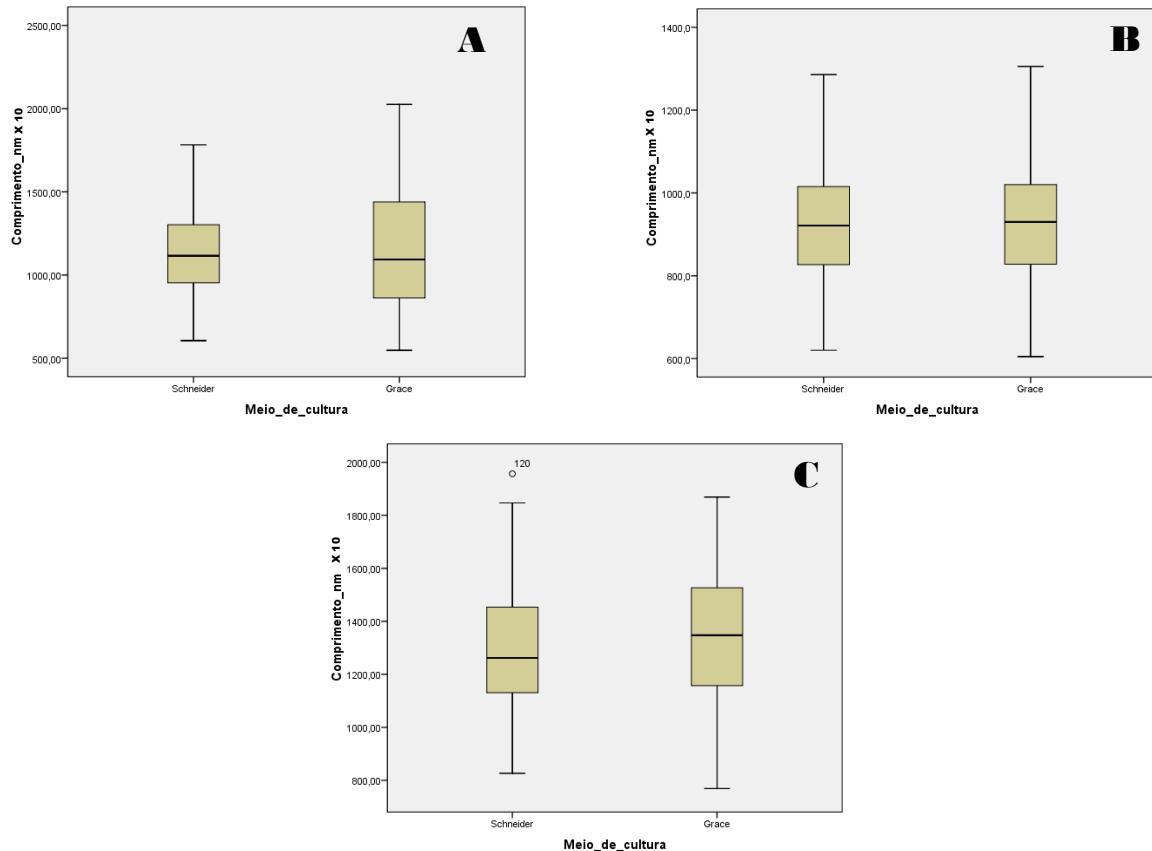
Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, cinquenta promastigotas

Aplicando testes de inferência estatística foi possível analisar, para cada estirpe, a diferença entre as médias de comprimento dos parasitas nos dois meios. Nenhuma estirpe apresentou uma



diferença significativa de tamanho médio dos promastigotas entre o meio de cultura Schneider e o meio de cultura Grace.

**Figura 19** Distribuição do comprimento dos parasitas nos dois meios de cultura



(A) *L. braziliensis* 1794, (B) *L. infantum* IMT260 e (C) *L. infantum* IMT373.

Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, cinquenta promastigotas.

### 2.3 Comprimento do corpo celular dos promastigotas em relação à fase de crescimento e ao meio de cultura

Foi feita uma análise tomando por amostra as quatro estirpes em simultâneo e, posteriormente, cada estirpe individualmente.

Todas as estirpes apresentaram um valor médio de comprimento do corpo celular dos promastigotas na fase estacionária de crescimento inferior ao observado, para a mesma estirpe, na fase logarítmica de crescimento, independentemente do meio de cultura (Quadro 4).

**Quadro 4** Distribuição dos comprimentos dos promastigotas em relação à fase de crescimento e ao meio de cultura.

Estirpe	Meio de cultura	Fase de crescimento	N	Mínimo (µm)	Máximo (µm)	Média (µm)
<i>L. braziliensis</i> 1794	Schneider	Logarítmica	126	6,57	17,82	<b>12,63</b>
		Estacionária	137	6,06	15,48	<b>11,00</b>
	Grace	Logarítmica	128	7,36	20,25	<b>14,18</b>
		Estacionária	125	5,47	15,15	<b>8,90</b>
<i>L. peruviana</i> HR78cl8	Schneider	Logarítmica	147	7,65	15,03	<b>10,99</b>
		Estacionária	120	4,25	9,60	<b>6,55</b>
<i>L. infantum</i> IMT260	Schneider	Logarítmica	121	6,85	12,86	<b>9,95</b>
		Estacionária	135	6,20	12,11	<b>8,86</b>
	Grace	Logarítmica	146	6,85	13,06	<b>9,99</b>
		Estacionária	122	6,05	11,04	<b>8,62</b>
<i>L. infantum</i> IMT373	Schneider	Logarítmica	120	8,85	19,57	<b>14,16</b>
		Estacionária	122	8,27	15,04	<b>11,74</b>
	Grace	Logarítmica	135	9,70	18,69	<b>14,61</b>
		Estacionária	127	7,69	17,32	<b>12,17</b>

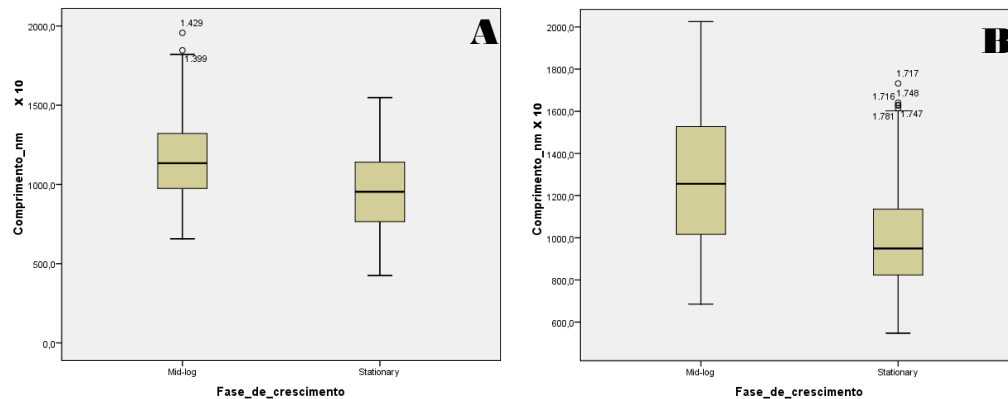
N- número de promastigotas medidos, seleccionados aleatoriamente.

Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, vinte e cinco promastigotas

Na análise estatística, todas as estirpes apresentaram uma diferença significativa entre as médias dos comprimentos dos parasitas da fase logarítmica e os da fase estacionária ( $p < 0.05$ ), independentemente do meio de cultura.

Tomando os dados de todas as estirpes juntos (Figura 20) ou tomando cada estirpe em separado (Figuras 21, 22, 23 e 24), os gráficos revelam sempre uma diferença, já provada ser significativa, entre as médias do comprimento dos parasitas na fase logarítmica e na fase estacionária independentemente do meio de cultura.

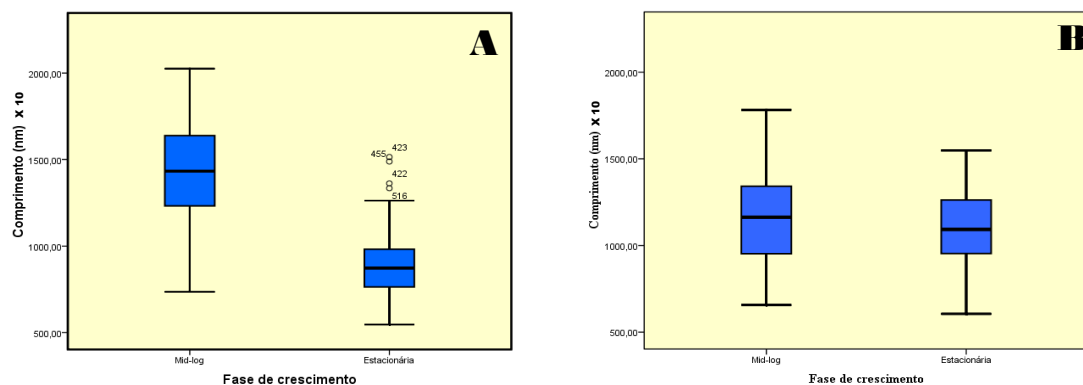
**Figura 20** Distribuição do comprimento dos parasitas de todas as estirpes em estudo nas duas fases de crescimento



(A) no meio Schneider e (B) no meio Grace. Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, vinte e cinco promastigotas

Analisando individualmente cada estirpe e começando por *L. braziliensis* 1794 verifica-se que esta estirpe apresenta uma diferença nas médias dos comprimentos dos parasitas nas duas fases de crescimento muito elevada em meio de cultura Grace mas pouco acentuada em meio de cultura Schneider (Figura 21). Esta estirpe apresentou ainda uma menor amplitude dos valores dos comprimentos dos parasitas na fase estacionária relativamente à fase logarítmica, isto é, apresentou, em cultura, populações mais homogéneas em comprimento na fase estacionária.

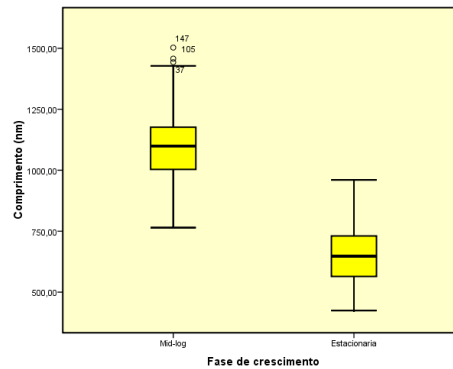
**Figura 21** Distribuição do comprimento dos parasitas *L. braziliensis* 1794 nas duas fases de crescimento.



(A) meio de cultura Schneider, (B) meio de cultura Grace. Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, vinte e cinco promastigotas.

*L. peruviana* HR78cl8 apresentou uma diferença entre a média do comprimento dos parasitas na fase logarítmica muito diferente da média na fase estacionária. Também esta estirpe apresentou uma menor amplitude de valores de comprimento na fase estacionária (Figura 22).

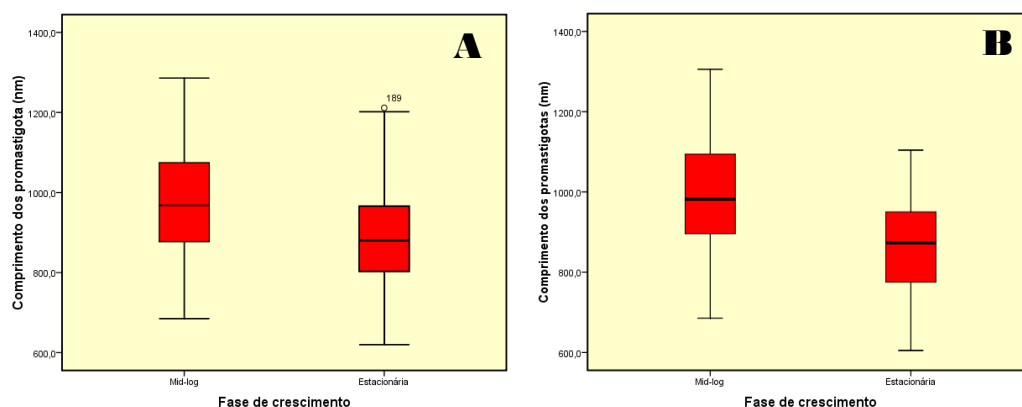
**Figura 22** Distribuição do comprimento dos parasitas *L. peruviana* HR78cl8 nas duas fases de crescimento no meio de cultura Schneider



Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, vinte e cinco promastigotas.

Na cultura de *L. infantum* IMT260 observa-se também um menor valor médio do comprimento do corpo dos promastigotas na fase estacionária acompanhado por uma menor amplitude de valores, mais notória, contudo, no meio de cultura Grace (Figura 23).

**Figura 23** Distribuição do comprimento dos parasitas *L. infantum* IMT260 nas duas fases de crescimento

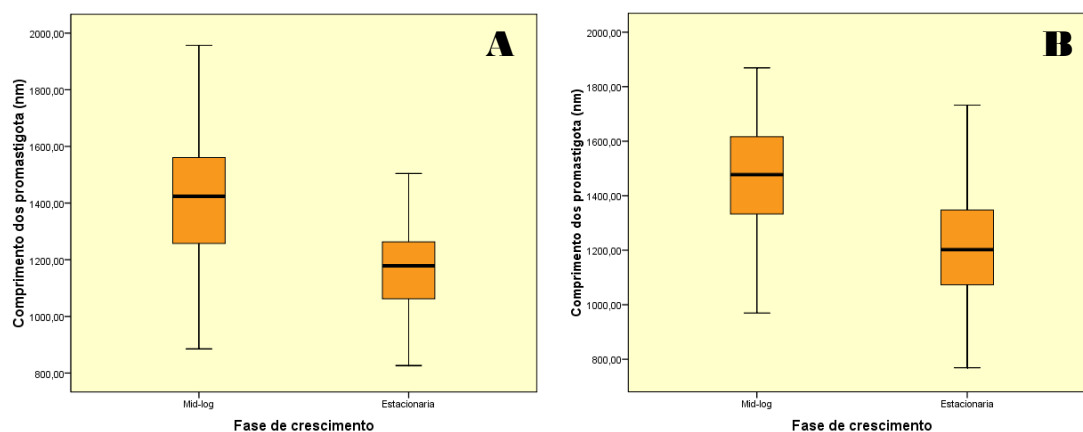


(A) meio de cultura Schneider, (B) meio de cultura Grace. Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, vinte e cinco promastigotas.

*L. infantum* IMT373 em meio de cultura Grace foi a única estirpe que apresentou maior amplitude de valores de comprimento dos parasitas na fase estacionária. Contudo, e como já foi

visto anteriormente, também esta estirpe apresentou uma menor média de comprimento do parasita na fase estacionária independentemente do meio (Figura 24).

**Figura 24** Distribuição do comprimento dos parasitas *L. infantum* IMT373 nas duas fases de crescimento



(A) meio de cultura Schneider, (B) meio de cultura Grace. Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, vinte e cinco promastigotas.

Em suma, na generalidade, as estirpes em estudo apresentaram um menor comprimento médio do parasita e uma menor amplitude de valores na fase estacionária de crescimento. A diferença de comprimento médio de parasita entre a fase logarítmica e a fase estacionária, após análise estatística, revelou-se significativa ( $p < 0.05$ ) para todas as estirpes e independentemente do meio de cultura.

## 2.4 Comprimento médio dos promastigotas em relação à percentagem de promastigotas metacíclicos em cultura

Cruzando o valor máximo da percentagem de promastigotas metacíclicos em cultura e a variável comprimento celular obtemos um comprimento médio das formas metacíclicas dessa estirpe nesse meio (Quadro 5). Trata-se de um comprimento médio de promastigotas metacíclicos aproximado devido à heterogeneidade das populações em cultura, isto é, a mistura de formas procíclicas e metacíclicas. Observou-se que a heterogeneidade das populações em cultura é

um factor muito relevante para as estirpes *L. infantum* IMT260 e *L. infantum* IMT373 que apresentaram, ao longo de todo o estudo de crescimento, um máximo de percentagem de formas metacíclicas muito baixo, 10 e 5% respectivamente (Figura 25).

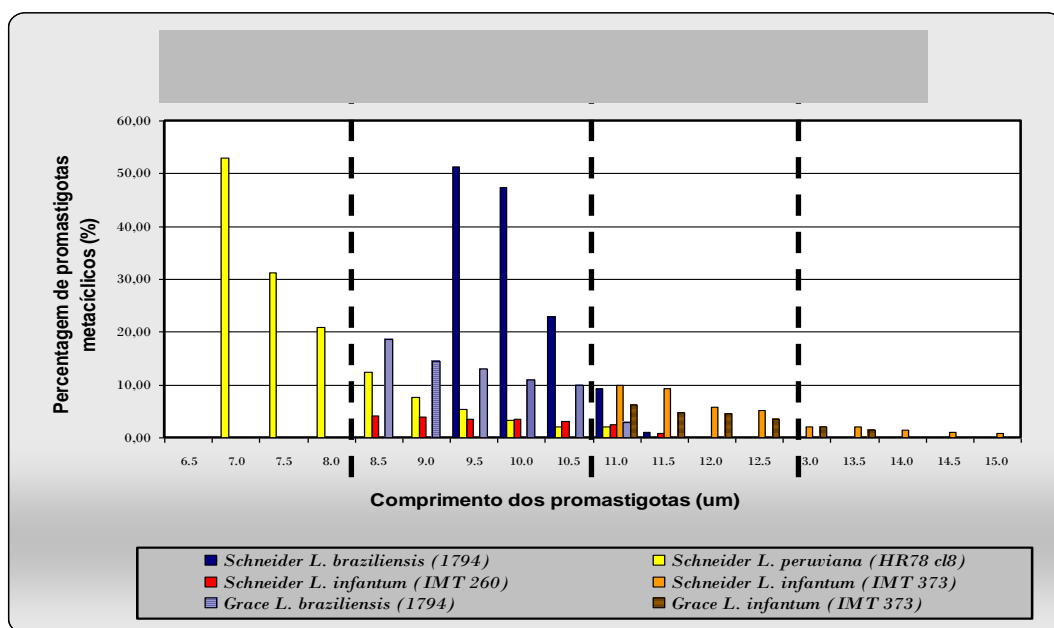
**Quadro 5** Comprimento médio dos promastigotas de cada estirpe na altura que se observa a maior percentagem de metacíclicos em cultura

Estirpe	Meio de cultura	N	Comprimento médio (μm)
<i>L. braziliensis</i> 1794	Schneider	263	9,5
	Grace	253	8,5
<i>L. peruviana</i> HR78cl8	Schneider	267	7,0
<i>L. infantum</i> IMT260	Schneider	256	8,5
<i>L. infantum</i> IMT373	Schneider	242	11,0
	Grace	262	11,0

N- número de promastigotas medidos, seleccionados aleatoriamente.

Os resultados apresentados são as médias de oito contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, vinte e cinco promastigotas

**Figura 25** Variação do comprimento dos promastigotas em função da percentagem de formas metacíclicas na cultura



Meio de cultura Schneider -Colunas cheias; meio de cultura Grace – colunas às riscas

As linhas a tracejado representam intervalos de comprimento médio das formas metacíclicas de uma dada estirpe. Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos, pelo menos, vinte e cinco promastigotas.

Observou-se uma separação das estirpes, independentemente do meio de cultura, ao longo do eixo de variação do comprimento dos promastigotas (Figura 25 - linhas verticais a tracejado). *L. peruviana* apresentou as formas metacíclicas mais pequenas do estudo, variando entre 6,5  $\mu\text{m}$  e 8  $\mu\text{m}$ . *L. braziliensis* e *L. infantum* IMT260 apresentaram comprimentos de formas metacíclicas no intervalo de 8,5  $\mu\text{m}$  a 10,5  $\mu\text{m}$ . Por último, *L. infantum* IMT373 apresentou formas metacíclicas com comprimento médio no intervalo de 11,0  $\mu\text{m}$  a 12,5  $\mu\text{m}$ .

## 2.5 Teste do Complemento

O teste do Complemento foi aplicado com dois objectivos: verificar se é, de facto, um bom método para isolar promastigotas metacíclicos e, uma vez isolados, verificar se cada estirpe possui um determinado comprimento médio de promastigota metacíclico. Foram comparados resultados nos dois meios de cultura usados neste estudo – Schneider e Grace – bem como os resultados já obtidos para o comprimento médio das formas metacíclicas (ver ponto 2.4 do presente capítulo) sem a aplicação deste teste.

### 2.5.1 Sobrevivência dos promastigotas em cultura após aplicação do teste de lise pelo Complemento

Observou-se, entre as estirpes em estudo, uma sensibilidade variável à lise pelo Complemento presente no soro.

O controlo positivo à acção do Complemento provocou a lise membranar total em todas as estirpes tal como o factor de diluição 1:1 (Quadro 6). No factor de diluição do soro humano de 1:2 nenhuma cultura apresentou uma percentagem de sobrevivência de promastigotas superior a 5% após a realização do teste. A espécie *L. infantum* (estirpes IMT260 e IMT373), espécie do Velho Mundo, revelou uma sensibilidade superior ao complemento, relativamente às outras espécies

estudadas, ambas espécies do Novo Mundo, começando a apresentar promastigotas vivos só a partir do factor de diluição 1:8. *L. braziliensis* 1794 e *L. peruviana* HR78cl8 apresentaram uma sensibilidade semelhante ao Complemento.

**Quadro 6** Valores das percentagens de sobrevivência dos promastigotas em cultura à acção do Complemento presente em soro humano

Estirpe	Fase de crescimento	Controlo Negativo EDTA (% de sobrevivência)	Controlo positivo Soro sem diluição (% de sobrevivência)	Factor de diluição do soro							
				1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>L. braziliensis</i> 1794	Logarítmica	95	0	0	2	5	19	30	53	82	96
	Estacionária	97	0	0	2	13	39	51	66	85	98
<i>L. peruviana</i> HR78cl8	Logarítmica	98	0	0	1	4	18	41	69	90	97
	Estacionária	100	0	0	5	16	42	64	75	88	98
<i>L. infantum</i> IMT260	Logarítmica	91	0	0	0	0	3	11	24	67	88
	Estacionária	90	0	0	0	0	4	10	39	72	90
<i>L. infantum</i> IMT373	Logarítmica	89	0	0	0	0	0	2	15	59	88
	Estacionária	87	0	0	0	0	4	12	42	65	86

Percentagem de sobrevivência calculada com base na concentração da amostra inicial antes da submissão ao teste. Os resultados apresentados são as médias de oito contagens independentes em câmara de Neubauer. Só foram contabilizados vivos os promastigotas com movimento.

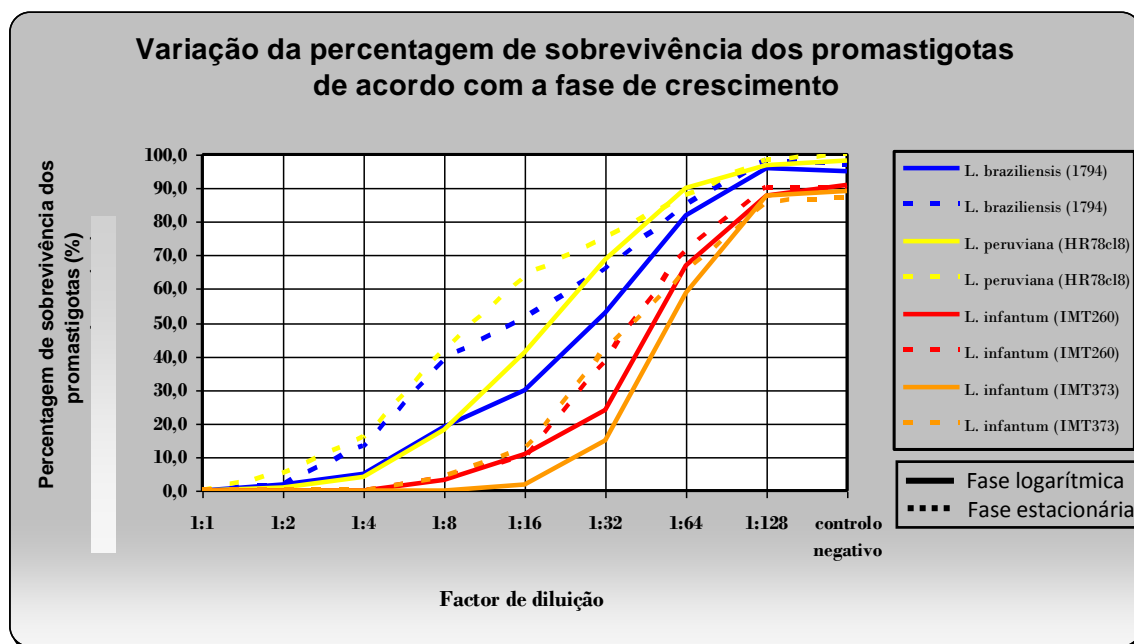
Os factores de diluição com a percentagem de sobrevivência de promastigotas mais baixa correspondem à população mais homogénea de promastigotas metacíclicos. Com o aumento da diluição do soro as populações nos poços vão sendo cada vez mais heterogéneas, isto é, com uma mistura de promastigotas procíclicos e metacíclicos, uma vez que, quanto mais diluído o soro está, mais formas procíclicas resistem à lise. Deixa de ocorrer lise membranar dos promastigotas quando a percentagem de sobrevivência nos poços se assemelha à observada no controlo negativo.

Através da análise gráfica verificou-se que as curvas de sobrevivência dos promastigotas nas crescentes diluições de soro humano apresentam, o que se assemelha a uma curva logarítmica, terminando num patamar (Figura 26). O factor de diluição a partir do qual começam a aparecer promastigotas não lisados nos poços das placas corresponde ao início ascendente da curva. Observou-se que este factor de diluição foi de 1: 2 para *L. braziliensis* e *L. peruviana* e de 1:4 para *L. infantum*. O ponto em que a curva atinge um patamar horizontal corresponde ao factor de



diluição do soro a partir do qual não ocorre lise membranar devido ao complemento, isto é, a sobrevivência dos parasitas não é afectada pela acção do complemento. Este patamar corresponde ao factor de diluição 1:128 para todas as estirpes.

**Figura 26** Variação da percentagem de sobrevivência dos promastigotas nas duas fases de crescimento



Percentagem de sobrevivência calculada com base na concentração da amostra inicial antes da submissão ao teste. Os resultados apresentados são as médias de oito contagens independentes.

Nas diluições extremas, tanto nas menores – 1:1 e 1:2 – como nas maiores – 1:64 e 1:128, não se observaram diferenças na percentagem de sobrevivência dos promastigotas de culturas em diferentes fases de crescimento numa mesma estirpe ( $p > 0,05$ ). Foi nas diluições intermédias – 1:8, 1:16 e 1:32 – que se observaram diferenças significativas na percentagem de sobrevivência dos promastigotas da fase logarítmica em relação aos da fase estacionária ( $p < 0,05$ ). *L. braziliensis* e *L. peruviana* apresentaram diferenças significativas na percentagem de sobrevivência dos promastigotas nas duas fases de crescimento para as diluições de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. *L. infantum* IMT373 só revelou diferenças significativas nas diluições 1:16 e 1:32 e *L. infantum* IMT260 unicamente na diluição 1:32.

Foi sempre na fase estacionária de crescimento que todas as estirpes apresentaram as mais elevadas percentagens de sobrevivência de promastigotas para uma mesma diluição.

## 2.5.2 Comprimento dos promastigotas em cultura após aplicação do teste de lise pelo Complemento

Primeiramente analisemos o factor “meio de cultura” como variável independente.

Todas as estirpes apresentaram, independentemente do meio, comprimentos médios de parasita no controlo negativo significativamente semelhantes aos apresentados para os factores de diluição de 1:64 e 1:128 ( $p > 0,05$ ), excepção foi *L. infantum* (IMT260) que só apresentou semelhança significativa com o controlo negativo para o factor de diluição 1:128, tendo sido assim a estirpe que, aparentemente, apresenta maior sensibilidade à acção do complemento (Quadro 7).

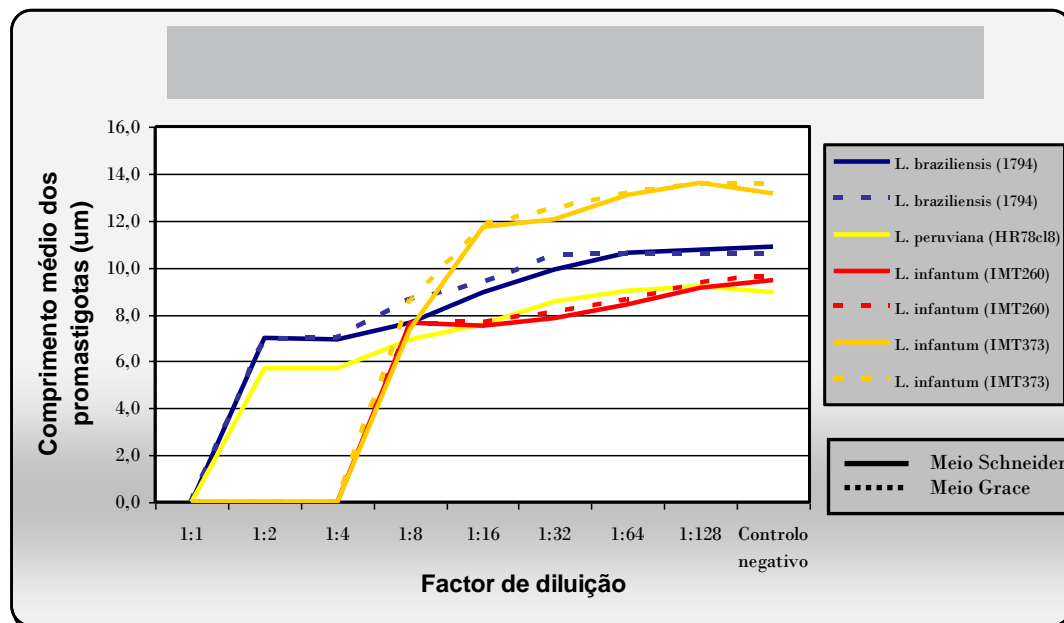
**Quadro 7** Comprimento médio dos promastigotas nos dois meios de cultura estudados após aplicação do teste de lise pelo Complemento

Estirpe	Meio de cultura	Controlo Negativo ( $\mu\text{m}$ )	Factor de diluição							
			1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>L. braziliensis</i> 1794	Schneider	10,90	0,0	<b>7,01</b>	6,92	7,65	8,95	9,93	10,61	10,73
	Grace	10,55	0,0	<b>6,95</b>	6,98	9,02	10,33	10,49	10,58	10,58
<i>L. peruviana</i> HR78cl8	Schneider	8,96	0,0	<b>5,72</b>	5,68	6,93	7,61	8,56	9,01	9,20
<i>L. infantum</i> IMT260	Schneider	9,48	0,0	0,00	0,00	<b>7,62</b>	7,49	7,84	7,74	9,12
	Grace	9,62	0,0	0,00	0,00	<b>7,57</b>	7,61	8,92	9,12	9,33
<i>L. infantum</i> IMT373	Schneider	13,12	0,0	0,00	0,00	<b>7,38</b>	11,73	12,08	13,09	13,61
	Grace	13,55	0,0	0,00	0,00	<b>8,61</b>	11,80	12,48	13,13	13,51

Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos vinte e cinco promastigotas. A unidade de medida de todos os valores tabelados é o  $\mu\text{m}$ .

Verificou-se que, em relação à aplicação do teste da lise pelo Complemento, as estirpes não apresentaram diferenças no comprimento médio dos promastigotas entre os dois meios de cultura estudados ( $p > 0,05$ ) (Figura 27).

**Figura 27** Variação do comprimento médio dos promastigotas nos dois meios de cultura após a aplicação do teste de lise pelo Complemento



Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos vinte e cinco promastigotas.

Relativamente à variação do comprimento médio dos promastigotas entre as duas fases de crescimento e após a sujeição destes ao teste da lise pelo Complemento, verificou-se que, tal como no estudo de crescimento em 2.3, foi na fase estacionária de crescimento que se obtiveram os comprimentos médios de promastigotas mais baixos (Quadro 8).

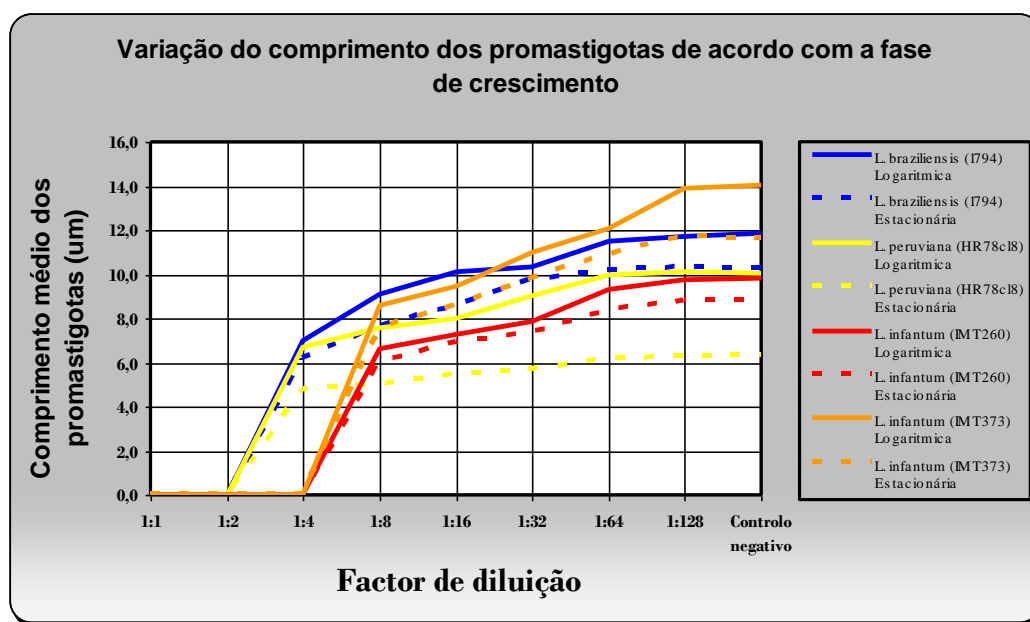
**Quadro 8** Comprimento médio dos promastigotas nas duas fases de crescimento após aplicação do teste de lise pelo Complemento

Estirpe	Fase de crescimento	Controlo negativo (µm)	Factor de diluição							
			1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>L. braziliensis</i> (1794)	Logarítmica	11,82	0,00	<b>6,99</b>	9,11	10,13	10,32	11,52	11,62	11,74
	Estacionária	10,23	0,00	<b>6,21</b>	7,63	8,56	9,72	10,20	10,30	10,31
<i>L. peruviana</i> (HR78cl8)	Logarítmica	10,02	0,00	<b>6,69</b>	7,55	8,01	9,05	9,94	9,97	10,10
	Estacionária	6,31	0,00	<b>4,82</b>	5,05	5,42	5,67	6,20	6,20	6,29
<i>L. infantum</i> (IMT260)	Logarítmica	9,81	0,00	0,00	0,00	<b>6,64</b>	7,28	7,82	9,32	9,77
	Estacionária	8,77	0,00	0,00	0,00	<b>6,01</b>	6,89	7,36	8,33	8,80
<i>L. infantum</i> (IMT373)	Logarítmica	14,02	0,00	0,00	0,00	<b>8,61</b>	9,43	11,01	12,04	13,87
	Estacionária	11,63	0,00	0,00	0,00	<b>7,55</b>	8,56	9,79	10,90	11,70

Os resultados apresentados são as médias de quatro contagens independentes. Em cada contagem foram medidos vinte e cinco promastigotas. A unidade de medida de todos os valores tabelados é o µm

Como esperado, todas as estirpes apresentaram curvas correspondentes à fase estacionária de crescimento das culturas com comprimentos médios celulares inferiores em todos os seus pontos em comparação com a curva correspondente à fase logarítmica de crescimento da mesma estirpe (Figura 28).

**Figura 28** Variação do comprimento médio dos promastigotas nas duas fases de crescimento das culturas após aplicação do teste de lise pelo Complemento



Os resultados apresentados são as médias de oito contagens independentes. Em cada contagem foram medidos vinte e cinco promastigotas.

Em suma e comparando, para cada estirpe, os valores do comprimento médio dos promastigotas correspondentes à fase estacionária (fase de crescimento da cultura que apresenta valores máximos de formas metacíclicas segundo diversos autores)<sup>3</sup>, os valores obtidos quando a cultura apresentava um máximo de formas metacíclicas e os valores obtidos pelo método de isolamento de formas metacíclicas pela acção do Complemento, verificou-se que, foi com a aplicação do teste do Complemento que se obtiveram os valores mais baixos (Quadro 9). Este resultado sugere que, com este teste, se conseguem obter populações mais homogêneas de promastigotas metacíclicos.

<sup>3</sup> Giannini, 1974; Sacks&Perkins, 1984; Frank *et al.*, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Grimm *et al.*, 1991; Bates&Tetley, 1993; Zakai *et al.*, 1997; Louassini *et al.*, 1998

**Quadro 9** Quadro resumo do comprimento médio mais baixo de promastigota obtido, para cada estirpe, em cada um dos métodos usados

Estirpe	Estudo Morfológico ( $\mu\text{m}$ )		Teste do Complemento ( $\mu\text{m}$ )
	Fase estacionária de crescimento	Percentagem máxima de formas metacíclicas	
<i>L. braziliensis</i> 1794	9,95	9,00	<b>6,98</b>
<i>L. peruviana</i> HR78cl8	6,55	7,00	<b>5,72</b>
<i>L. infantum</i> IMT260	8,86	8,50	<b>7,60</b>
<i>L. infantum</i> IMT373	11,96	11,00	<b>7,80</b>

Os resultados apresentados são médias dos valores obtidos em cada um dos meios de cultura. A unidade de medida de todos os valores tabelados é o  $\mu\text{m}$ .

## 2.6 Fotografias de promastigotas das estirpes em estudo

A medição dos promastigotas das estirpes estudadas foi obtida recorrendo a um microscópio óptico equipado com material fotográfico e com um software indicado para tal (ver capítulo II Material e Métodos). Assim sendo foi possível criar uma colecção de fotos para cada estirpe, em cada um dos meios de cultura, em cada uma das fases de crescimento e em cada uma das diluições na aplicação do teste de lise pelo Complemento. Em baixo, apresenta-se uma amostra dessa colecção de fotografias.

### *L. braziliensis* 1794

*L. braziliensis* não apresentou diferenças significativas no comprimento médio do corpo celular dos promastigotas em meio Schneider comparativamente aos analisados em meio Grace, numa mesma fase de crescimento das culturas. As fotografias de *L. braziliensis* em meio de cultura Schneider e em meio de cultura Grace sugerem promastigotas mais estreitos em meio Grace quando comparados com os promastigotas observados em meio Schneider, em culturas na mesma fase de crescimento (Figuras 29 e 30).

**Figura 29** Promastigotas de *L. braziliensis* 1794 em meio de cultura Schneider



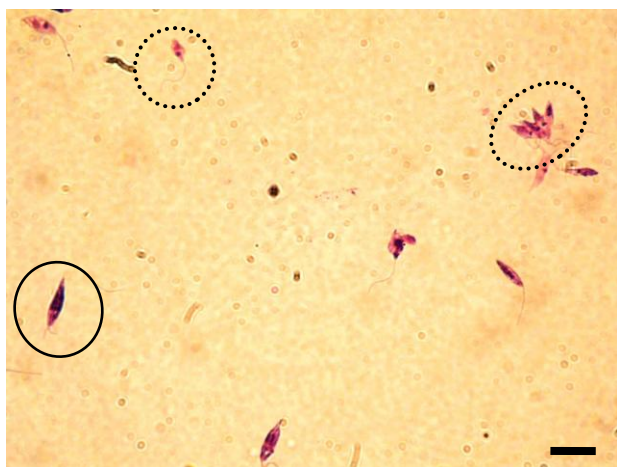
**Figura 30** Promastigotas de *L. braziliensis* 1794 em meio de cultura Grace



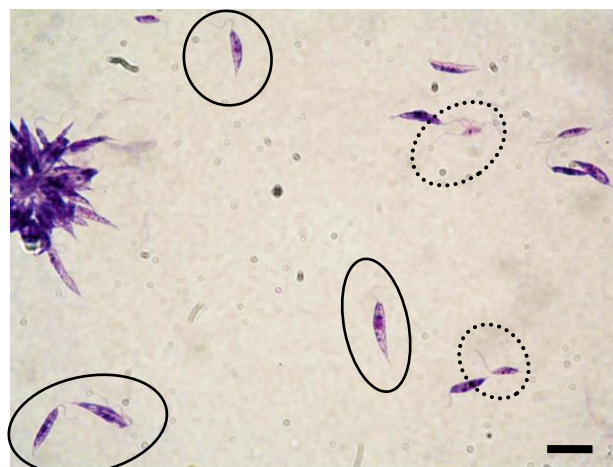
Ampliação de 1000x. Coloração com Giemsa. Barra equivale a 10 µm. Fotografias da autora.

Observando fotografias de lâminas resultantes do teste da lise pelo Complemento, factores de diluição 1:8 e 1:32, verifica-se a existência de uma população heterogénea, constituída por promastigotas procíclicos e promastigotas metacíclicos (Figura 31 e 32).

**Figura 31** *L. braziliensis* 1794. Teste da lise pelo complemento – factor de diluição 1:8.



**Figura 32** *L. braziliensis* 1794. Teste da lise pelo complemento – factor de diluição 1:32.



Círculos a cheio – formas procíclicas. Círculos a tracejado – formas metacíclicas. Amostras retiradas de culturas em meio Schneider. Ampliação 1000x. Coloração com Giemsa. Barra equivale a 10 µm. Fotografia da autora.



***L. peruviana* HR78cl8**

*L. peruviana* HR78cl8, como já foi mencionado anteriormente, só cresceu em meio Schneider (Figura 33 e 34) pelo que não se obtiveram imagens em meio Grace.

**Figura 33** Promastigotas de *L. peruviana* HR78cl8 na fase logarítmica de crescimento da cultura



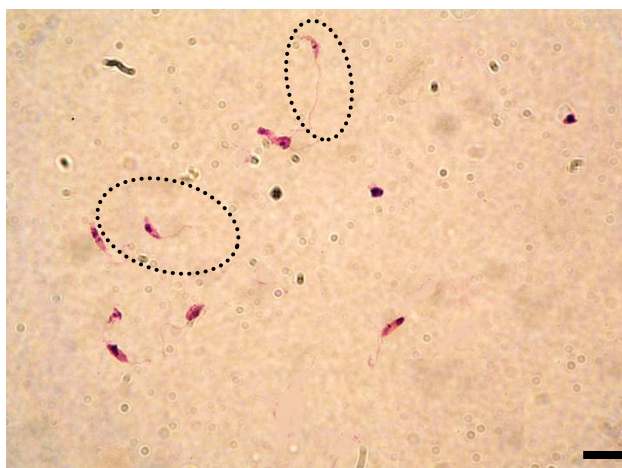
**Figura 34** Promastigotas de *L. peruviana* HR78cl8 na fase estacionária de crescimento da cultura



Círculos a cheio – formas procíclicas. Círculos a tracejado – formas metacíclicas. Meio de cultura Scheider. Ampliação 1000x. Coloração com Giemsa. Barra equivale a 10 µm. Fotografias da autora.

Comparando as Figuras 35 e 36, correspondentes a lâminas resultantes da aplicação do teste de lise pelo Complemento com factor de diluição do soro de 1:8 e 1:128 respectivamente, observa-se uma diferença entre as populações. Esta última trata-se de uma população heterogénea de promastigotas com a presença de formas procíclicas e formas metacíclicas. Por sua vez, a imagem correspondente ao factor de diluição 1:8 apresenta uma população homogénea de promastigotas metacíclicos.

**Figura 35** *L. peruviana* HR78cl8. Teste da lise pelo Complemento. Factor de diluição 1:8.



**Figura 36** *L. peruviana* HR78cl8. Teste da lise pelo Complemento. Factor de diluição 1: 128.



Círculos a cheio – formas procíclicas. Círculos a tracejado – formas metacíclicas. Meio de cultura Scheider. Ampliação 1000x. Coloração com Giemsa. Barra equivale a 10  $\mu$ m. Fotografias da autora.

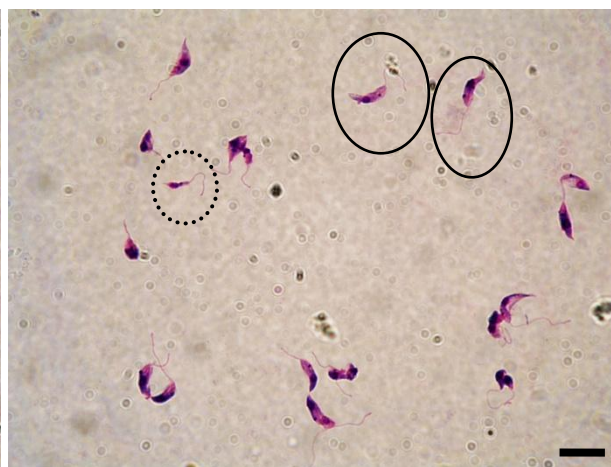
### *L. infantum* IMT260

As formas promastigota de *L. infantum* IMT260 não apresentaram diferenças significativas na média do comprimento celular nos dois meios de cultura estudados. Ambas as imagens das Figuras 37 e 38, foram obtidas na fase estacionária de crescimento justificando assim a heterogeneidade da população, isto é, a presença de formas procíclicas e metacíclicas.

**Figura 37** Promastigotas de *L. infantum* IMT260 em meio Schneider



**Figura 38** Promastigotas de *L. infantum* IMT260 em meio Grace

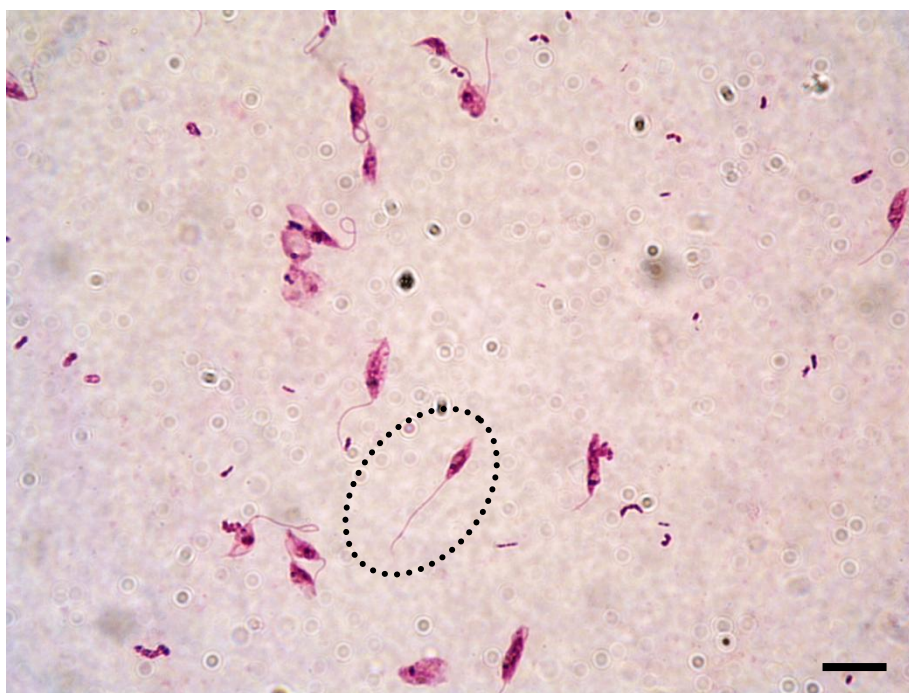


Círculos a cheio – formas procíclicas. Círculos a tracejado – formas metacíclicas. Fase estacionária de crescimento da cultura. Ampliação 1000x. Coloração com Giemsa. Barra equivale a 10  $\mu$ m. Fotografias da autora.



Na imagem da Figura 39, correspondente a uma preparação resultante do teste de lise pelo Complemento, factor de diluição 1:16, observa-se um promastigota metacíclico típico (segundo a descrição morfológica desta forma (ver ponto 1.2 do capítulo II - Material e Métodos).

**Figura 39** Promastigotas de *L. infantum* IMT260. Teste da lise pelo complemento. Factor de diluição 1:16



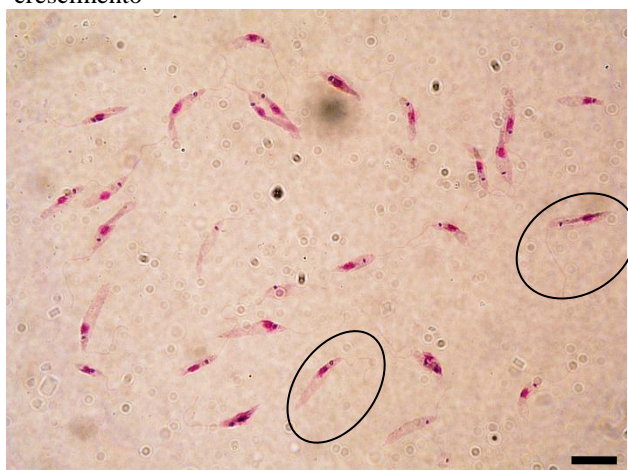
Pormenor de um metacíclico. Círculos a cheio – formas procíclicas. Círculos a tracejado – formas metacíclicas. Meio de cultura Schneider. Ampliação 1000x. Coloração com Giemsa. Barra equivale a 10 µm .Fotografia da autora.

### ***L. infantum* IMT373**

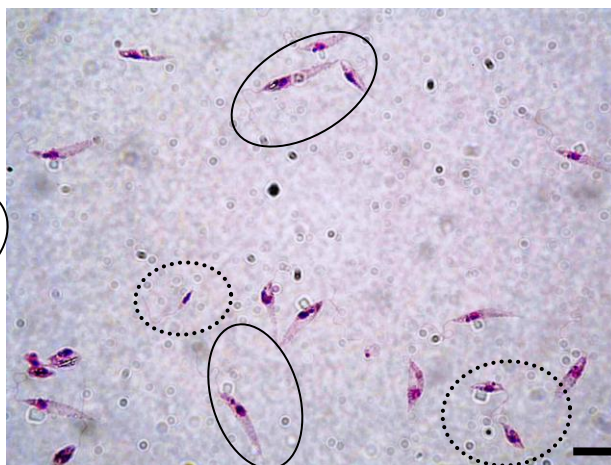
Como apresentado para as restantes estirpes deste estudo, também *L. infantum* IMT373 não apresentou diferenças significativas na média do comprimento celular das formas promastigotas nos dois meios de cultura estudados, numa mesma fase de crescimento.

As imagens das Figuras 40 e 41 representam, respectivamente, uma cultura de *L. infantum* IMT373 na fase logarítmica de crescimento em meio Schneider e uma cultura na fase estacionária de crescimento em meio Grace. Na imagem da Figura 41 observa-se uma população heterogénea, com formas promastigotas procíclicas e formas promastigotas metacíclicas.

**Figura 40** Promastigotas de *L. infantum* IMT373 em meio Schneider. Cultura na fase logarítmica de crescimento



**Figura 41** Promastigotas de *L. infantum* IMT373 em meio Grace. Cultura na fase estacionária de crescimento



Círculos a cheio – formas procíclicas. Círculos a tracejado – formas metacíclicas. Ampliação 1000x. Coloração com Giemsa. Barra equivale a 10 µm. Fotografias da autora.

## **Capítulo IV**

## **DISCUSSÃO**

Foi na década de 80 que se confirmou que o ciclo de vida da *Leishmania* sp inclui um desenvolvimento sequencial dos promastigotas de um estado não infeccioso para um estado infeccioso (Sacks&Perkins, 1984; Franke *et al.*, 1985; Wozencraft&Blackwell, 1987). Este processo designa-se por metaciclogénese. Dada a importância do aprofundamento do conhecimento da infecciosidade de *Leishmania* sp, nomeadamente para uma correcta caracterização dos factores de virulência e elaboração de possíveis vacinas, a metaciclogénese começou rapidamente a ser um dos principais temas de estudo em *Leishmania* sp (Da Silva&Sacks, 1987; Howard *et al.*, 1987; Puentes *et al.*, 1988; Bates&Tetley, 1993).

Neste estudo foram analisadas seis curvas de crescimento em dois meios de culturas diferentes, meio Schneider e meio Grace, correspondentes a uma estirpe não clonada e um clone *L. braziliensis* (1794 e Lc2452cl8, respectivamente), um clone *L. peruviana* (HR78cl8) e três estirpes *L. infantum* (IMT151, IMT260 e IMT373). Todas as estirpes foram consideradas como avirulentas, pois possuíam um número de passagens *in vitro* superior a dez (Santos-Gomes&Abranches, 1996).

As culturas axénicas em meio Schneider revelaram, para todas as estirpes estudadas, uma cinética de crescimento mais rápida, maior concentração de promastigotas, uma fase estacionária mais curta e um menor tempo de vida que as mesmas estirpes em culturas em meio Grace. Estes resultados sugerem que o meio de cultura usado influencia a cinética de crescimento e a longevidade das estirpes *in vitro*. Estudos anteriores já haviam demonstraram existir diferenças nas curvas de crescimento de *Leishmania* sp quando se usam meios de cultura diferentes (O'Daly&Rodriguez, 1988).

Analisando separadamente as três estirpes *L. infantum* (IMT151, IMT260 e IMT373) seria de esperar uma maior homogeneidade de perfil e cinética entre elas relativamente às outras espécies *Leishmania* em estudo. Contudo, à parte da semelhança de perfil apresentada pelas estirpes IMT151 e IMT373 em meio Schneider, não se observou um perfil de crescimento constante da espécie. Diversos autores já haviam demonstrado uma forte heterogeneidade entre isolados *L. infantum* ao

nível da cinética de crescimento (Rioux *et al.*, 1986; Angelini *et al.*, 1989; Gramiccia&Gradoni, 1989; Pacheco *et al.*, 1990; Mendez *et al.*, 2001). *L. infantum*, por apresentar uma heterogeneidade na sua forma clínica, que vai desde a clássica leishmaniose visceral até à leishmaniose cutânea, com alguns casos de leishmaniose mucocutânea já reportados (Alvar *et al.*, 1990; Tomson *et al.*, 2002; Kharfi *et al.*, 2003; Cobo *et al.*, 2003; Benmously-Mlika *et al.*, 2008; Garcia de Marcos *et al.*, 2007), supõe uma também marcada heterogeneidade biológica e molecular dentro de estirpes ou de isolados (Rioux *et al.*, 1986; Angelini *et al.*, 1989; Gramiccia&Gradoni, 1989; Pacheco *et al.*, 1990; Mendez *et al.*, 2001;). Esta heterogeneidade pode estar associada a variações na cinética de crescimento como as apresentadas neste trabalho. Mendez (2001) sugere mesmo uma estrutura multiclonal dos isolados *L. infantum*, isto é, a existência de diferentes clones dentro de um mesmo isolado que são mantidos por um equilíbrio instável das propriedades dos clones (cinética de crescimento, infecciosidade, imunidade) e sujeitos a modificações e selecção pelos vectores, hospedeiro vertebrado e meio de cultura *in vitro*.

Com base em dados genéticos recentes é cada vez mais aceite a hipótese que *L. peruviana* tenha derivado directamente de *L. braziliensis*, tendo adquirido as características que a diferenciaram como espécie num período em que o ciclo de transmissão se deslocou para Sul, mais precisamente para a cordilheira dos Andes (Dujardin *et al.*, 1993, 2000, 2002, Gamboa *et al.*, 2007). *L. peruviana* é endémica das montanhas dos Andes (entre os 300 e os 800 metros acima do nível do mar). Dada a proximidade genética destas duas espécies, poder-se-ia prever um comportamento semelhante *in vitro* ao nível da cinética de crescimento, apesar de outras características como as manifestações clínicas que causam, a virulência que apresentam e a distribuição geográfica serem diferentes entre estas duas espécies (Dujardin *et al.*, 1995). No presente estudo, a estirpe *L. peruviana* mostrou ser muito diferente das estirpes *L. braziliensis*, apresentando cinética de crescimento, tal como o perfil de metaciclogénese distintos. Outros autores já demonstraram existir marcadas diferenças no perfil de crescimento e na infecciosidade destas duas espécies (Gamboa *et al.*, 2007).

Em relação aos meios de cultura, no geral, as estirpes mostraram uma melhor adaptação ao meio de Schneider, tendo havido mesmo em meio Grace, uma estirpe que não se manteve viva (*L. peruviana* HR78cl8) e outra que não cresceu (*L. infantum* IMT260). Contudo, é importante ter em conta que a manutenção e crescimento das estirpes anterior à elaboração deste estudo de cinética do crescimento se realizaram em meio de cultura Schneider (com exceção de *L. peruviana* que se encontrava em meio  $\alpha$ -MEM) o que pode explicar a melhor adaptação das estirpes a este meio em comparação com o meio de cultura Grace e também o distinto perfil de crescimento de *L. peruviana*. Um crescimento mais eficaz quando os parasitas já estão adaptados a um determinado meio de cultura já foi demonstrado em estudos anteriores (Celeste&Guimarães, 1988).

Relativamente à metaciclogénese, mais concretamente, à variação da concentração dos promastigotas metacíclicos em cultura ao longo do tempo, as estirpes em estudo apresentaram cinéticas muito diferentes entre o meio de cultura Schneider e o meio de cultura Grace. No meio de cultura de Schneider observou-se, para a maioria das estirpes, uma cinética comum com dois picos nos valores da percentagem das formas metacíclicas em cultura, correspondendo o primeiro pico a uma percentagem de cerca de 30% e o segundo a 50%. Em relação à fase de crescimento da cultura, este primeiro pico na curva da percentagem de formas metacíclicas correspondeu à fase logarítmica na estirpe *L. braziliensis* 1794, à fase estacionária na estirpe *L. peruviana* e a uma fase de declínio nas duas estirpes *L. infantum* (IMT260 e IMT373). Todas as estirpes apresentaram o segundo pico de percentagem máxima de promastigotas metacíclicos 5 a 6 dias após o início da fase estacionária. Este pico máximo de percentagem de metacíclicos não correspondeu assim, em nenhuma estirpe, ao pico máximo de densidade de promastigotas em cultura mas sim a uma fase já de declínio da população. Outros estudos de metaciclogénese *in vitro* apresentaram valores máximos de formas metacíclicas em cultura em datas correspondentes à fase estacionária de crescimento da mesma cultura (Giannini, 1974; Sacks&Perkins, 1984; Frank *et al.*, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Grimm *et al.*, 1991; Bates&Tetley, 1993; Zakai *et al.*, 1997; Louassini *et al.*, 1998). Da Silva&Sacks (1987) demonstrou, que para um mesmo clone, culturas de promastigotas considerados avirulentos



desenvolvem as formas metacíclicas mais tarde e em menor número que as mesmas culturas classificadas como virulentas. Estes autores obtiveram uma percentagem máxima de metacíclicos de 90% ao 6º dia para o clone virulento e de unicamente 40% ao 10º dia para o avirulento (com 24 passagens em cultura). O número de gerações dos parasitas influencia fortemente o processo da metaciclogénese (Giannini, 1974; Nolan&Herman, 1985; Da Silva&Sacks, 1987; Grimm *et al.*, 1991). Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com estes autores na medida em que, sendo todas as estirpes usadas classificadas como avirulentas, seria de esperar uma percentagem máxima de promastigotas metacíclicos baixa (inferior a 50 %) e tardia como se verificou.

Observou-se para todas as estirpes, que o meio Schneider proporcionou populações de promastigotas metacíclicos mais homogéneas, isto é, as culturas atingiam percentagens máximas de formas metacíclicas mais elevadas (superiores a 50% em quatro das seis estirpes estudadas), em comparação com as de Grace em que coexistiram populações mais heterogéneas (percentagens máximas inferiores a 32% para todas as estirpes estudadas).

Em suma, o meio de cultura Schneider revelou ser, para as estirpes estudadas, um meio de cultura mais eficaz para a produção de populações de promastigotas metacíclicos *in vitro* que o meio Grace.

Diversos estudos revelaram que a metaciclogénese de *Leishmania* sp. está associada a alterações morfológicas, para além de alterações bioquímicas e moleculares, reflectindo provavelmente uma adaptação bioquímica e um papel específico do parasita a um determinado estágio do seu ciclo de vida (Mallinson&Coombs, 1989; Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998; Da Silva&Sacks, 1987; Pinto-da-Silva *et al.*, 2002; Genestra *et al.*, 2004; Sacks, 1985; Franke *et al.*, 1985). Esta correlação entre infecciosidade e redução do volume celular sugere que a medição dos promastigotas metacíclicos é um parâmetro eficaz para os distinguir dos procíclicos (Grimm *et al.*, 1991; Saraiva *et al.*, 2005; Späth&Beverley, 2001).

Os resultados do estudo morfológico dos parasitas, mais precisamente a análise da evolução do comprimento destes ao longo da sua curva de crescimento, mostraram não existir uma diferença significativa entre os comprimentos médios dos parasitas no meio de cultura Schneider e no meio de cultura Grace para uma mesma estirpe, levando a concluir que o meio de cultura não influencia o comprimento dos promastigotas.

Contudo, as fotografias obtidas dos promastigotas sugerem para *L. braziliensis*, em culturas na mesma fase de crescimento, promastigotas mais estreitos em meio de cultura Grace em relação aos observados em meio Schneider. Pondo isto, futuros estudos de morfologia deverão ter em consideração, não só o comprimento do promastigota, como também a sua largura.

O mesmo não se conclui relativamente à variável “fase de crescimento”, a qual apresentou diferenças significativas no comprimento médio dos promastigotas para todas as estirpes estudadas. Todas as estirpes apresentaram comprimentos médios de parasita significativamente inferiores na fase estacionária de crescimento. Outros autores já haviam obtido resultados semelhantes (Walters *et al.*, 1987; Howard&Miles, 1987; Lawyer *et al.*, 1987; Bates&Tetley, 1993; Almeida, 1993; Abou el Naga & Moneim, 2000; Späth & Beverley, 2001).

Relativamente ao teste da lise pelo Complemento, os promastigotas na fase estacionária de crescimento apresentaram uma maior resistência à lise membranas, isto é, uma maior percentagem de sobrevivência à acção do Complemento presente no soro humano, relativamente aos mesmos na fase logarítmica de crescimento em todas as estirpes estudadas. Uma crescente resistência ao Complemento já foi demonstrada estar correlacionada com a fase de crescimento dos parasitas, mais concretamente com o menor tamanho celular destes (Franke *et al.*, 1985; Howard *et al.*, 1987; Puentes *et al.*, 1988; Grimm *et al.*, 1991).

As estirpes do Novo Mundo (*L. braziliensis* 1794 e *L. peruviana* HR78 cl8) revelaram uma menor sensibilidade à lise pelo Complemento em relação às estirpes *L. infantum* do Velho Mundo (IMT260 e IMT373). Este resultado sugere que, embora não se tenha obtido uma concordância nos



perfis de crescimento nem no comprimento de parasita, as estirpes do Novo Mundo partilham uma estrutura e composição de superfície semelhante, o que leva uma resposta à acção do Complemento semelhante. O mesmo se poderá dizer relativamente às duas estirpes do Velho Mundo que também revelaram, entre si, uma sensibilidade semelhante à acção do Complemento. Gamboa *et al* (2007) apresentou, num estudo com estirpes *L. braziliensis* e *L. peruviana*, resultados semelhantes de sensibilidade à lise pelo Complemento para estas duas estirpes embora os resultados de infecciosidade em macrófagos *in vitro* e em hamsters *in vivo* se tenham revelado muito diferentes. A maior sensibilidade à lise pelas estirpes *L. infantum*, relativamente às estirpes do Novo Mundo, poderá dever-se a uma maior sensibilidade desta espécie à metodologia desenvolvida para este teste. É de notar que esta espécie, *L. infantum*, apresentou, no controlo negativo, uma percentagem de sobrevivência de 87% ao invés dos 98% apresentados pelas espécies do Novo Mundo. É necessária uma optimização do Teste de lise pelo Complemento a fim de diminuir a mortalidade dos promastigotas de *L. infantum* no controlo negativo.

Comparando, para cada estirpe, os valores do comprimento médio dos promastigotas obtidos no estudo de crescimento - quer os obtidos na fase estacionária de crescimento da cultura (fase de crescimento da cultura que apresenta valores máximos de formas metacíclicas segundo diversos autores), quer os obtidos nas preparações dos dias de maior percentagem de formas metacíclicas em cultura, com os valores de comprimento médio obtidos pelo teste de lise pelo Complemento (método de isolamento de formas metacíclicas), verificou-se que, foi com este último que se obtiveram os valores mais baixos de comprimento celular de promastigota em cultura para todas as estirpes. Este resultado sugere que, com este teste, obtêm-se populações mais homogéneas de promastigotas metacíclicos, isto é, obtêm-se o valor de comprimento dos promastigotas metacíclicos em cultura para cada estirpe estudada. Este facto já havia sido verificado por Bates&Tetley (1993).

*L. peruviana* foi a estirpe a apresentar um menor comprimento de metacíclicos enquanto que *L. infantum* (IMT373) foi a estirpe a apresentar um comprimento de metacíclicos maior. Obteve-se neste trabalho, com a aplicação do teste de lise pelo Complemento, um comprimento médio dos promastigotas metacíclicos de 6,98  $\mu\text{m}$  para *L. braziliensis*, de 5,72  $\mu\text{m}$  para *L. peruviana* e de 7,70  $\mu\text{m}$  para *L. infantum*.

As diferenças entre os comprimentos médios dos promastigotas metacíclicos das espécies estudadas podem ser devido às características bioquímicas e genéticas próprias de cada espécie ou a factores externos da experimentação. É possível que com optimização do processo de isolamento de promastigotas metacíclicos se obtenha um comprimento celular médio inferior. Posteriormente, seria importante verificar se estas diferenças no tamanho estão correlacionadas com variações de propriedades biológicas dos metacíclicos e com a infecciosidade de macrófagos *in vitro* e *in vivo*.

# Capítulo V

## BIBLIOGRAFIA

**Abou el Naga I. F., el Moneim Sharaf I. A.** (2000). Metacyclogenesis of *Leishmania major* in an acidic medium. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **30**(2):431-40.

**Aliaga L., Cobo F., Mediavilla J. D., Bravo J., Osuna A., Amador J. M., Martín-Sánchez J., Cordero E., Navarro J. M.** (2003). Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine (Baltimore)*, **82**(3):147-58.

**Almeida M., Cuba C., de Sa C. M., Pharoah M., Howard K., Miles M.** (1993). Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis in vitro*: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**(3):325-9.

**Alvar J., Ballesteros J. A., Soler R., Benito A., Van Eys G. J., Schoone G. J., Cabrer B.** (1990). Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: biochemical characterization. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**(6):614-8.

**Alvar J., Gutiérrez-Solar B., Pachón I., Calbacho E., Ramírez M., Vallés R., Guillén J. L., Cañavate C., Amela C.** (1996). AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clinics in Dermatology*, **14**(5):541-6.

**Angelini M. C., Gramiccia M., Gradoni L.** (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, **99**(3):301-309.

**Bandyopadhyay P., Ghosh D. K., De A., Ghosh K. N., Chaudhuri P. P., Das P., Bhattacharya A.** (1991). Metacyclogenesis of *Leishmania* spp: species-specific *in vitro* transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles. *Journal of Parasitology*. **77**(3):411-416.

**Bates P. A.** (1994). The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, **79**: 215-218.

**Bates P. A.** (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, **37**: 1097-1106.

- Bates P. A., Tetley L.** (1993). *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Experimental Parasitology*, **76**: 412-423.
- Beaver P. C., Jung R. C., Cupp E.** (1984). "Clinical Parasitology" Ed. 9, *Lea & Febiger*, Philadelphia
- Belazzoug S., Lanotte G., Maazoun R., Pratlong F., Rioux J. A.** (1985). Un nouveau variant enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent de la leishmaniose cutanée du Nord de l'Algérie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **60**:1-3.
- Benmously-Mlika R., Fenniche S., Kerkeni N., Aoun K., Khedim A., Mokhtar I.** (2008). Primary *Leishmania infantum* MON-80 endonasal leishmaniasis in Tunisia. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, **135**(5):389-92.
- Bryceson A. D.** (1996). Leishmaniasis. In: *Manson's Tropical Diseases*. 20<sup>th</sup> ed. Cook, G. C. (Ed.) W. B. Saunders Company, London, Philadelphia, Toronto, Sidney, pp. 1213 – 1244.
- Campino L.** (1998). Leishmanioses em Portugal. Características Emergentes da Epidemiologia e do Diagnóstico. Dissertação de doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Lisboa.
- Campino L., Santos-Gomes G., Pratlong F., Dedet J. P., Abranches P.** (1994<sup>a</sup>). HIV/*Leishmania* co-infections in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**:394.
- Campino L., Santos-Gomes G., Pratlong F., Antunes F., Maurício I., Dedet J., Abranches P.** (1997). HIV/*Leishmania* co-infections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of *Leishmania*. *Annales of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**:433-436.
- Celeste B. J., Guimarães M. C.** (1988). Growth curves of *Leishmania braziliensis braziliensis* promastigotes and surface antigen expression before and after adaptation to Schneider's *Drosophila* medium as assessed by anti-*Leishmania* human sera. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **30**(2):63-7.
- Chappuis F., Sundar S., Hailu A., Ghalib H., Rijal S., Peeling R. W., Alvar J., Boelaert M.** (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Review. *Nature Publishing Group*, **5**: 873-882.

**Coura J. R., Galvão-Castro B., Grimaldi J. G.** (1987). Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **82**(4):581-2.

**Cysne-Finkelstein L., Rosane M. T., Aguiar F., Leon L.** (1998). *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Experimental Parasitology*, **89**:58–62.

**Dedet J. P.** (1993). *Leishmania* et Leishmanioses du continent américain. *Annales de L'Institut Pasteur*, **4**: 3-25.

**Dedet J. P.** (2000). Les Leishmanioses actualités. *La press Médical*, **29**:1019-1926.

**Dedet J. P., Pratlong F.** (2003). Leishmaniasis. In: *Manson's tropical diseases*. Cook GC & Zumba A Eds. *WB Saunders*. 21th Ed. London, pp 1338-1364.

**Desjeux P.** (2001). The increase risk factors for Leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **95**:239–243.

**Desjeux P.** (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **27**:305-318.

**Diehl Ada R. S., dos Santos R., Zimmerman R., Letícia P., Weiss T., Jacobson P., Goldani L. Z.** (2004) Microscopy and polymerase chain reaction detection of *Leishmania chagasi* in the pleural and ascitic fluid of a patient with AIDS: Case report and review of diagnosis and therapy of visceral leishmaniasis. *The Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, **15**(4).

**Dórea R., Barboza-Filho C., Moreira D., Guirro M., Chaves A., Muniz D., Ricardo J., Soares E., Santos-Júnior V., Spinosa W.** (2003). Behavior of *Leishmania major* metacyclic promastigotes during the course of infection and immune response development in resistant versus susceptible hosts. *Brazilian Journal of Microbiology*, **34**(1):17-20.

**Dujardin J. C., Llanos-Cuentas A., Caceres A., Arana M., Dujardin J. P., Guerrini F., Gomez J., Arroyo J., De Doncker S., Jacquet D., et al.** (1993). Molecular karyotype variation in *Leishmania (Viannia) peruviana*: indication of geographical populations in Peru distributed along a north-south cline. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **87**(4):335-47.

**Dujardin J. C., Bañuls A. L., Victoir K., De Doncker S., Arevalo J., Llanos-Cuentas A., Tibayrenc M., Le Ray D.** (1995). From population to genome: ecogenetics of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **89**(1):45-53.

**Dujardin J. C., Henriksson J., Victoir K., Brisse S., Gamboa D., Arevalo J., Le Ray D.** (2000). Genomic rearrangements in trypanosomatids: an alternative to the "one gene" evolutionary hypotheses? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **95**(4):527-34.

**Dujardin J. C., Victoir K., De Doncker S., Guerbouj S., Arévalo J., Le Ray D.** (2002). Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **96**(1):S81-6.

**Franke E. D., McGreevy P., Katz S., Sacks D. L.** (1985). Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *The Journal of Immunology*, **134** (4).

**Gamboa D., Torres K., Doncker S., Zimic M., Arevalo J., Dujardin J.** (2007). Evaluation of an *in vitro* and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*, **135**(3):318-26.

**Gamboa D., Van Eys D., Victoir K., Torres K., Adaui V., Arevalo J., Dujardin J.** (2007). Putative markers of infective life stages in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitology*, **134**(Pt 12):1689-98.

**Genestra M., Cysne-Finkelstein L., Leon L.** (2004). Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell Biochemistry and Function*. **22**:315–320.

**Giannini M. S.** (1974). Effects of promastigotes growth phase, frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. *Journal of Parasitology*, **21**:521-527.

- Gramiccia M., Gradoni L.** (1989). Successful *in vitro* isolation and cultivation of Italian dermatropic strains of *Leishmania infantum sensu lato*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **83**(1):76.
- Grimm F., Brun R., Jenni L.** (1991). Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitology research*, **77**:185-191.
- Grimm F., Jenni L.** (1992). Human serum resistant promastigotes of *Leishmania infantum* in the midgut of *Phlebotomus perniciosus*. *Acta Tropica*, **52**(4): 267-273.
- Herwaldt B. L.** (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, **354**(9185):1191-1199.
- Howard M. K., Sayers G., Miles M. A.** (1987). *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Experimental Parasitology*, **64**:147–156.
- Kharfi M., Fazaa B., Chaker E., Kamoun M. R.** (2003). Mucosal localization of leishmaniasis in Tunisia: 5 cases. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, **130**(1 Pt 1):27-30.
- Killick-Kendrick R.** (1979). The biology of *Leishmania* in Phlebotomine sandflies. In: *Biology of kinetoplastida*, Vol II. Lumsden, W. H. R & Evans, D.A. (Eds.), *Academic press*, London / New York: 395-460.
- Killick-Kendrick R.** (1990) The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine Comparée*. **65**: 37-42.
- Kuhls K., Maurício I., Pratlong F., Presber W., Schönián G.** (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. *Microbes Infection*, **11-12**: 1224-1234.
- Kuhls K., Keilonat L., Ochseither S., Schaar M., Schweynoch C., Presber W., Schönián G.** (2007). Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated population between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infection*, **9**:334-343.



**Lainson R., Shaw J. J.** (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis. Biology and Medicine*. Peters, W. & Killick-Kendrick, R. (Eds.), *Academis Press*, New York, London, **1**: 1-120.

**Lanotte G.** (1975). Le foyre de leishmaniose viscérale dès Cévennes. Limites et strutures. Essai méthodologique. Tese de doutoramento. Faculté de Medicine de Montpellier.

**Laurenti M. D., Orin A., Sinhorini I. L., Corbett C. E.** (2004). The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Brazilian Journal of Medicine and Biology Research*, **37**(3):427-34.

**Lira R., Mendez S., Carrera L., Jaffe C., Neva F., Sacks, D.** (1998). *Leishmania tropica*: The identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. *Experimental Parasitology*, **89**:331–342.

**Louassini M., Adroher F., Foulquié M., Benítez R.** (1998). Investigations on the *in vitro* metacyclogenesis of a visceral and a cutaneous human strain of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, **70**:355–368.

**Lukeš J., Maurício I., Schonian G., Dujardin J., Soteriadou K., Dedet J., Kuhls K., Wilber K., Jirku M., Chocholova E., Haralambous C., Pratlong F., Obornik M., Horak A., Ayala F.J., Miles M.** (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **104**(22): 9375–80.

**Mallinson D. J. & Coombs G. H.** (1989). Biochemical characteristics of metacyclic forms of *Leishmania major* and *Leishmania mexicana mexicana*. *Parasitology*. **98**:7–15.

**Mauël J.** (1990). Macrophage-Parasite Interactions in *Leishmania* Infections. Review. *Journal of Leukocyte Biology*, **47**:187-193.

**Maurício I. L., Stothard J.R., Miles M.A.** (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, **16**:188-189.

- Méndez S., Fernández-Pérez F. J., Santín M., De La Fuente C., Cuquerella M., Gómez-Muñoz M. T., Alunda J.M.** (2001). Correlation between *in vitro* and *in vivo* infectivity of *Leishmania infantum* clones. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**(6):616-21.
- Moreno I., Molina R., Toraño A., Laurin E., García E., Domínguez M.** (2007). Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of *Leishmania infantum* promastigotes derived from axenic culture or from *Phlebotomus perniciosus*. *Microbes Infection*, **9** (14-15):1574-1580.
- Mukhopadhyay N. K., Saha A. K., Lovelace J. K., Silva R., Sacks D. L., Glew R. H.** (1988). Comparison of the protein kinase and acid phosphatase activities of five species of *Leishmania*. *Journal of Protozoology*, **35**:601-7.
- Nolan T. J., Herman R.** (1985). Effects of long-term *in vitro* cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Protozoology*, **32**(1):70-5.
- O'Daly J., Rodríguez M.** (1988). Differential growth requirements of several *Leishmania* sp. in chemically defined culture media. *Acta Tropica* (Basel), **45**:109-126.
- Pacheco R. S., Grimaldi G. Jr., Momen H., Morel C. M.** (1990). Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitology*, **100**(3):393-398.
- Pinto-da-Silva L., Camurate M., Costa K., Oliveira S., Cunha-e-Silva N., Saraiva E.** (2002). *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages *in vitro* and hamsters *in vivo*. *International Journal for Parasitology*, **32**: 1371-77.
- Pires C. A.** (1984). Phlébotomes du Portugal. I. Infestations naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus*, Newstead, 1911 par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **59**:521-524.
- Pires C. A.** (2000). Os flébotomos de Portugal (Diptera. Psychodidae). III. Exofilia e endofilia de *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus*, no foco de Kala-azar da Arrábida. *Actas III Congresso Ibérico de Entomologia*, Dezembro, Garnada, 821-828.

**Puentes S. M., Sacks D. L., da Silva R. Joiner K. A.** (1988). Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*. **167**: 887-902.

**Puentes S., Da Silva R., Sacks D. L., Hammer C., Keith A.** (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *The Journal of Immunology*, **145** (12):4311-4316.

**Rioux J.A., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P., Périeres J.** (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **65**:111-125.

**Rioux J. A., Moreno G., Lanotte G., Pratlong F., Dereure J., Rispail P.** (1986) Two episodes of cutaneous leishmaniasis in man caused by different zymodemes of *Leishmania infantum* s.l. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**(6):1004–5.

**Rogers K. A., Dekrey G. K., Mbow M. L., Gillespie R. D., Brodskyn C. I., Titus R. G.** (2002). Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiology Letters*, **209**(1):1-7.

**Sacks D. L.** (1988). Developmental biology of *Leishmania* promastigotes. In: P.T. Englund, A. Sher (Eds.), *The Biology of Parasitism: A Molecular and Immunological Approach*. Alan R. Liss, New York, pp. 93–103.

**Sacks D. L.** (1989). Minireview. Metacyclogenesis in *Leishmania* Promastigotes. *Experimental Parasitology*, **69**.

**Sacks D. L., Perkins P. V.** (1984). Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, **223**:1417-9.

**Sacks D. L., Hieny S., Sher A.** (1985). Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *Journal of Immunology*, **135**(1):564-9.

**Sacks D. L., Perkins P. V.** (1985). Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **34**:456-459.

- Sacks D. L., Pimenta P.F.** (1995). Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, **181**:685–97.
- Santos-Gomes G.** (1995). Caracterização biológica de *Leishmania infantum*. Estudos de virulência e patogenia da infecção de estirpes isoladas em Portugal. Tese. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, **163** pp.
- Santos-Gomes G., Abranches P.** (1996). Comparative study of infectivity caused by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitologica*, **43**:7-12.
- Saraiva E., Pimenta P. F., Brodin T. N., Rowton E., Modi G. B., Sacks D. L.** (1995). Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, **111**:275-287.
- Saraiva E., Pinto-da-Silva L., Wanderley J., Bonomo A., Barcinski M., Moreira M.** (2005). Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology*, **110**: 39–47.
- Shaw J.** (1994). Taxonomy of the genus *Leishmania*. Present and future trends and their implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **89**:471-478.
- da Silva R., Sacks D. L.** (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity*, **55** (11):2802-6.
- Späth G., Beverley S. M.** (2001). A Lipophosphoglycan-Independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Experimental Parasitology*, **99**:97–103.
- Tomson N., Symonds R. P., Moir A. A., Kendall C. H., Wiselka M.J.** (2002). New World leishmaniasis from Spain. *Postgraduate Medical Journal*, **78**(926):757-8.
- Walport M.** (1996). Complement: activation, complement receptors, biological effects. In Roitt I, Brostoff J and Male D (eds). *Immunology*. London: Mosby, 13.1-13.17.

**Walters L. L., Modi G. B., Tesh R. B., Burrage T.** (1987). Host-parasite relationship of *Leishmania mexicana mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **36**:294-314.

**Wozencraft A., Blackwell J. M.** (1987). Increased infectivity of stationary-phase promastigotes of *Leishmania donovani*: correlation with enhanced C3 binding capacity and CR3- mediated attachment to host macrophages. *Immunology*, **60**:559-63.

**Zakai H. A., Chance M. L., Bates P. A.** (1998). In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology*, **116**:305–9.

## ANEXOS

## 1. Meios de Cultura

### 1.1 Meio de cultura $\alpha$ -MEM

- ❖  $\alpha$ -MEM em pó
- ❖ 2.2 0g de NaHCO<sub>3</sub>
- ❖ 0.59 g de L-glutamina
- ❖ 3.00 g de G-glucose
- ❖ 10.00g de HEPES

Dissolver em cerca de 800 ml de água destilada, sob agitação.

Adicionar as seguintes soluções:

- ❖ Hemina 5 mg em 500 $\mu$ l NaOH (1N) + 9.95ml H<sub>2</sub>O
- ❖ Adenina 40 mg em 500 $\mu$ l NaOH (1N) + 9.50 mg H<sub>2</sub>O
- ❖ Ácido Fólico 5 mg em 40 $\mu$ l NaOH (1N) + 9.96 mg H<sub>2</sub>O
- ❖ D-biotina 2 mg em 100 $\mu$ l NaOH (1N) + 9.90 mg H<sub>2</sub>O

Adicionar:

- ❖ Gentamicina 50  $\mu$ l/ml
- ❖ 10 ml Urina Humana

Acertar o pH da solução, 7.5  $\pm$ 0.5

Filtrar a solução sob condições estéreis. Guardar a 4°C.

### 1.2 Meio de cultura Schneider, pH de 5.5

- 1- Coloque 800 ml água ultra-pura num balão de vidro.
- 2- Adicionar lentamente o meio Schneider em pó (Sigma). Acrescente mais 10 ml de água ultra pura no balão de vidro de forma a remover o resto do pó do meio de Schneider
- 3- Adicione 150 mg L-fenilalanina.
- 4- Adicione 400 mg bicarbonate de sódio.
- 5- Dissolva 600 mg CaCl<sub>2</sub> (Sigma) em 50 ml de água ultra pura e acrescente ao meio.
- 6- Ajuste o pH para 5.5 com HCl 1 N ou NaOH 1N.
- 7- Adicione 500  $\mu$ l gentamicina (50 mg/ml- Sigma G1397).
- 8- Adicione 20 ml de urina filtrada (preferencialmente de macho) (2%).
- 9- Filtre a solução
- 10- Adicione 100 ml fetal calf serum (10%).

### 1.3 Meio de Cultura Grace

- ❖ meio Grace
- ❖ 2 mM piruvato
- ❖ 2 mM glutamina
- ❖ 200 U/ml penicilina
- ❖ 200µg/ml estreptomicina
- ❖ 1mg/ml 5-fluorocitosina
- ❖ 2% aminoácidos essenciais
- ❖ 1% aminoácidos não essenciais
- ❖ 100mM de L-prolina
- ❖ 0,75 de sais
- ❖ 10% FCS
- ❖ 1% de urina

Preparar o meio com água destilada.

Ajustar o pH a 5,5 usando HCL ou NaOH.

Filtrar a solução sob condições estéreis. Guardar a 4°C.